

Aus dem Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. J. Gropp

VERGLEICH DER BIOLOGISCHEN
AKTIVITÄT UND STABILITÄT
VERSCHIEDENER MENADION-
UND MENADIOLPRÄPARATIONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfgang Mehringer
aus
Selb

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. J. Gropp

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1 Wirkungsweise von Vitamin K	3
2.1.1 Geschichtlicher Überblick	3
2.1.2 Neuere Untersuchungsergebnisse	4
2.1.3 Neueste Ergebnisse	12
2.2 Vitamin K Formen	18
2.2.1 Natürlich vorkommende Vitamin K Formen	18
2.2.2 Künstlich hergestellte Vitamin K Formen	21
2.3 Resorption von verschiedenen Vitamin K Formen aus dem Darm	24
2.4 Toxizität von Vitamin K	25
2.5 Vitamin K Antagonisten	26
2.6 Biologische Tests für Vitamin K	29
2.6.1 Allgemeines	29
2.6.1.1 Besonderheiten beim Huhn	34
2.6.2 Die kurative Testmethode	35
2.6.3 Prophylaktisches Testverfahren	36
3. Eigene Untersuchungen	38
3.1 Methodik	40
3.1.1 Tiermaterial	41
3.1.2 Fütterung	41
3.1.2.1 Herstellung der Rationen	44
3.1.3 Haltung der Versuchstiere	45
3.1.4 Thromboplastinzeitbestimmung	45
3.1.4.1 Handhabung des Gerätes	49

	Seite
3.1.4.2	Arbeitsablauf während eines Versuchstages 53
3.1.5	Blutentnahmetechnik 55
3.1.6	Reinigung der benutzten Geräte 59
3.1.7	Thrombokinaseherstellung 60
3.1.8	Statistische Auswertungsverfahren 61
3.2	Testsubstanzen 62
4.	Versuch I 64
4.1	Versuchsanlage 64
4.2	Versuchsdurchführung 66
4.3	Ergebnisse 67
4.3.1	Mortalität 70
4.3.2	Thromboplastinzeit 71
5.	Versuch II 74
5.1	Versuchsanlage 74
5.2	Versuchsdurchführung 76
5.3	Ergebnisse 77
5.3.1	Vorperiode 77
5.3.2	Versuchsperiode 77
5.3.2.1	Mortalität 79
5.3.2.2	Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung 80
5.3.2.3	Thromboplastinzeit 81
6.	Versuch III 85
6.1	Versuchsanlage 85
6.2	Versuchsdurchführung 88
6.3	Ergebnisse 90
6.3.1	Mortalität 90
6.3.2	Thromboplastinzeit 91
7.	Versuch IV 95
7.1	Versuchsanlage 95
7.2	Versuchsdurchführung 95

	Seite
7.3	Ergebnisse
7.3.1	Mortalität
7.3.2	Thromboplastinzeit
8.	Diskussion
9.	Zusammenfassung
9.1	Summary
10.	Tabellenanhang
11.	Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

Die heute übliche Ergänzung von Mischfuttermitteln mit Vitamin K-Präparationen stellt sich als nicht unproblematisch dar, da oftmals Zweifel an der Stabilität dieser Substanzen angebracht sind. Ausgenommen davon sind stabilisierte Produkte (Stabilisierung durch "Coating"). Von solchen Präparaten aber muß angenommen werden, daß Nachteile hinsichtlich der intestinalen Verfügbarkeit bestehen könnten.

Trotz dieser Mängel der einzelnen Vitamin K Formen muß aber die Zufütterung als notwendig angesehen werden. Dies vor allen Dingen in der modernen Geflügelhaltung; hier wird die natürliche Aufnahme von Vitamin K über Koprophagie verhindert. Auch fortschrittliche Herstellungsweisen der Mischfuttermittel (Hitzeeinwirkung beim Pelletieren) und die Verdrängung von Grünfutteranteilen aus den Rationen bedingen eine mehr oder minder starke Abnahme von Vitamin K im Futter.

Diese Überlegungen führten dazu, die handels-
üblichen Futtertypen mit einer bis zu zehn-
fachen Überdosierung des Bedarfs an Vitamin K
herzustellen. Es ist daher von hohem praktischen
und wirtschaftlichen Interesse nach neuen
stabileren Vitamin K wirksamen Produkten
zu suchen, welche die nachteiligen Einflüsse
der Herstellung und Lagerung unbeschadet
überstehen können.

Es ist Ziel dieser Arbeit neue Vitamin K
Substanzen sowie bekannte Menadionverbindungen,
die aus verbesserten Syntheseverfahren stammen
(meist Produkte mit höherer Reinheit) im
biologischen Test an Küken auf ihre Wirksamkeit
zu prüfen.

2. LITERATUR

2.1 Wirkungsweise von Vitamin K

2.1.1 Geschichtlicher Überblick

Dam et al (1935) entdeckten das Vitamin K als antihämorrhagischen Faktor. Sie erkannten, daß dieser dazu benötigt wird, äquivalente Konzentrationen von Prothrombin im Plasma aufrechtzuerhalten. Dam versuchte, die Wirkungsweise jenes Vitamins zu erklären und nahm an, daß es ein Teil des Prothrombinmoleküls sei. Quick und Collentine (1951) versuchten, nachdem das Cumarin entdeckt worden war, die Wirkung so zu erklären, daß Vitamin K und alle Antikoagulantien um ein einziges Enzym konkurrieren, welches mit der Synthese des Prothrombins in Zusammenhang steht. Martius und Nitz-Litzow (1954) hatten die Vermutung, Prothrombinmangel erkläre sich aus einer ATP-Mangelproduktion. Sie schlossen dies aus der Tatsache, daß Vitamin K in den Elektronentransport von Leberzell-mitochondrien eingreift. Prodie (1961) hat dies auch bewiesen, jedoch nur für einige Bakterienarten.

2.1.2 Neuere Untersuchungsergebnisse

Olson (1965) stellte 4 Theorien betreffend die Mitwirkung des Vitamin K an der Synthese des Prothrombins zur Diskussion:

- a) Vitamin K katalysiert die Bildung einer mRNA für Prothrombin.
- b) Regulatorproteintheorie: dieses Protein ist in der Lage, sowohl Vitamin K als auch Cumarinderivate zu binden. Bei Anwesenheit des Vitamins wirkt der Vitamin K-Regulatorprotein-Komplex als Starter für die Prothrombinsynthese, indem die mRNA für Prothrombin an die Ribosomen der Leberzelle treten kann. Ist dagegen kein Vitamin K vorhanden, oder sind Cumarinderivate anwesend, wird vom Regulatorprotein eine mRNA an die Ribosomen vermittelt, an denen dann ein Gegenstück des Prothrombins - das sogenannte Isoprothrombin - gebildet wird. Dieses ist inaktiv.

- c) Interaktion des Vitamin K mit einem unbekannten Protein, welches die Umwandlung des Ursprungspeptids, das von den Ribosomen entlassen wurde, katalysiert.
- d) Vitamin K unterstützt nicht die Prothrombinsynthese, sondern die Ausschleusung von Gerinnungsproenzymen aus der Leberzelle.

Tatsächlich wurden einige Jahre später sogenannte "Gegensätzliche Proteine" entdeckt (R.E. Olson, J.W. Suttie unveröffentlicht), wie sie Olson in seiner Regulatorproteintheorie forderte. Analog der Nomenklatur der Isoenzyme bezeichnete Morrissey (1973) diese Proteine als Iso-prothrombin. Trotzdem postulierte Suttie (1973) eine postribosomale Beteiligung des Vitamin K an der Prothrombinsynthese. Demzufolge formen ein Enzym und eine unbekannte prosthetische Gruppe aus Präprothrombin, das mit dem Iso-prothrombin identisch ist, mit Hilfe von Vitamin K Prothrombin.

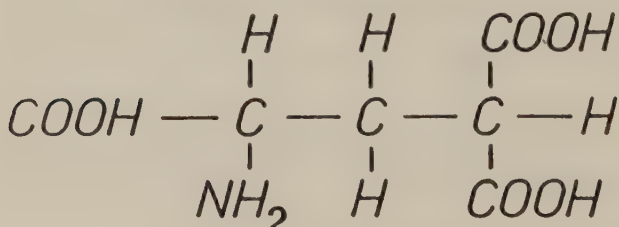
Olson hielt aber an seiner Regulatorproteintheorie (Vitamin K-Wirksamkeit ribosomal) fest. Er versuchte Sutties Theorie zu widerlegen, indem er Ergebnisse von Barnhart und Anderson (1964) zitierte. Danach müßte bei Vitamin K Mangel keine Umwandlung in Prothrombin stattfinden, also in der Leber aller Spezies vermehrt Isoprothrombin auftreten. Diese Erscheinung konnte jedoch bei Rindern und Hunden nicht festgestellt werden.

Suttie (1974) untermauerte seine Theorie, indem er eigene Versuche und solche von Bell und Matschiner (1969) als Beweis heranzog. In diesen genannten Experimenten wurde die Möglichkeit eines Vorläuferproteins für Prothrombin entdeckt, als hypoprothrombinämischen Ratten Vitamin K appliziert wurde. Eine Phase, in der die Prothrombinkonzentration nur langsam anstieg, folgte nach 30 bis 60 Minuten ein plötzliches Anschwellen des Plasmaprothrombins. Bell und Matschiner (1969) haben klar darauf hingewiesen, daß die Rate der Prothrombinsynthese während dieser Anfangsphase die

theoretische Bildungskapazität übersteigt. Diese Theorie wurde auch durch eine weitere Beobachtung gestützt. Appliziert man hypoprothrombinämischen Ratten gleichzeitig mit der Vitamin K-Gabe radioaktiv markierte Aminosäuren, wird kein radioaktiv markiertes Prothrombin gebildet.

Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Wirkungsweise des Vitamin K war das Erkennen des Vitamin K-Epoxid-Zyklus (1976). Danach würde die Synthese von Prothrombin und den Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren in einem metabolischen Zyklus ablaufen, bei welchem Vitamin K oxidiert und reduziert wird über dessen 2,3-Epoxidmetaboliten. Zwei Enzyme sind dabei beteiligt: Phyllochinon-Epoxidase und Phyllochinon-Epoxid-Reduktase. Warfarin blockiert letztere, so daß in Lebern von warfarinisierten Ratten Phyllochinon-Epoxid vermehrt auftritt (Bell und Matschiner 1969).

Suttie und Jackson (1977) berichteten in einer Abhandlung über Ergebnisse von Stenflo et al (1974), daß die Glutaminsäurereste im Prothrombin-molekül als γ -Carboxyglutaminsäure auftreten. Struktur der γ -Carboxyglutaminsäure:



Suttie schloß daraus, daß der Vitamin K abhängige Schritt in der Bildung des Prothrombins die Carboxylierungsreaktion sei. Er gab hierzu 3 Möglichkeiten an:

- a) Vitamin K labilisiert das H-Atom am γ -Kohlenstoffatom der Glutaminsäure des Vorläuferproteins, um CO_2 zu akzeptieren.
- b) Vitamin K fungiert als CO_2 -Aktivator oder CO_2 -Überträger für die Carboxylierungsreaktion.

c) Das Vitamin aktiviert eines der am Geschehen beteiligten Enzyme.

Mit der Bildung der γ -Carboxyglutaminsäure werden dem Prothrombin seine Ca^{++} -bindenden Eigenschaften und die Fähigkeit, mit Phospholipiden in Kontakt zu treten, gegeben (Magnusson 1974).

Willingham und Matschiner (1974) vermuten, daß die Epoxidbildung ein obligatorischer Schritt in der Vitamin K Wirkung ist. Beobachtungen, daß Epoxidbildung und Vitamin K abhängige Carboxylierung eng zusammenhängen, führte zur Annahme, daß beide Reaktionen benötigt werden, um dem mikrosomalen Elektronentransport genüge zu leisten.

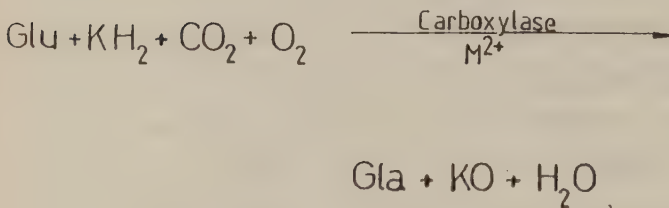
Olson (1978) wies darauf hin, daß eine Reduktion von Vitamin K zu Hydrochinon notwendig sei, sowohl für die Carboxylierungsreaktion als auch für die Epoxidbildung.

Wallin et al (1978) haben diesen Gedanken aufgegriffen und in Versuchen mit mikrosomalen Leberzellsystemen eine isolierte NAD(P)H-Dehydrogenase aus dem Versuchsansatz entfernt. Dadurch ging die Carboxilierungsfähigkeit verloren, wurde aber durch NAD(P)H-Dehydrogenase und oxidiertes Vitamin K (Quinon) wieder erreicht. Letzteres gelang auch durch Zugabe von reduziertem Vitamin K (Hydrochinon). Dieses System wurde durch Warfarin und Tetrachloropyridinol gehemmt. Matschiner et al (1974) konnten auch beweisen, daß im Vitamin K-Epoxid-Zyklus die Reduktaseaktivität durch die oben genannten Substanzen gehemmt wird. Angenommen wird nun, daß Vitamin K (Quinon) in seiner reduzierten Form (Hydrochinon) an der Carboxilierungsreaktion beteiligt ist und zum Epoxid umgewandelt wird. Letzteres wird anschließend im Vitamin K-Epoxid-Zyklus wieder zum Vitamin K.

Suttie (1982) konnte eine Vitamin K abhängige Carboxylase nachweisen, welche in der Lage ist spezifische Glutamyl-Reste auf endogene Vorläuferproteine der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX und X) oder auf exogen zugeführte einfache Peptidsubstrate zu übertragen. Dies konnte er an in vitro Versuchen mit mikrosomalen Rattenleberpräparationen demonstrieren. Das Enzym benötigt dabei reduziertes Vitamin K (Hydrochinon), Sauerstoff und CO_2 . Die gleiche Präparation enthält auch ein Enzym, welches reduziertes Vitamin K in Vitamin K-2, 3-Epoxid umwandelt. Suttie nahm an, daß Carboxylierung und Epoxidbildung vom gleichen Enzym katalysiert werden. Reduziertes Vitamin K kann exogen zugeführt werden oder aus Vitamin K-Quinonen und dazu passenden Reduktionsmitteln gebildet werden. Eine im Cytosol befindliche Warfarin empfindliche NAD(P)H-Quinon-Dehydrogenase kann für die Reduktion von Vitamin K verantwortlich sein.

2.1.3 Neueste Ergebnisse

Suttie (1982) versuchte den Mechanismus der Vitamin K abhängigen γ -Carboxylierung von Glutaminsäure wie folgt zu erklären.



Glu = Glutaminsäure

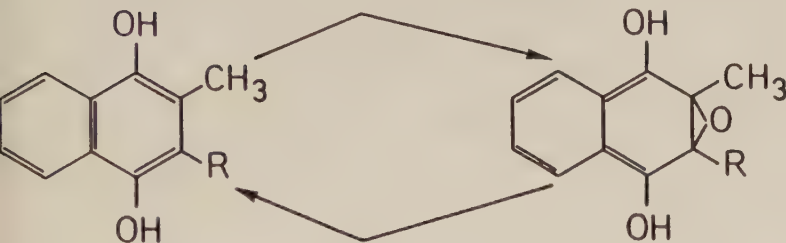
KH_2 = reduziertes Vitamin K (Hydrochinon)

M^{2+} = divalentes Metall als Katalysator für
die Carboxylase

Gla = γ -Carboxyglutaminsäure

KO = Vitamin K-2,3-Epoxid

Hiermit ist die enge Verknüpfung von Carboxylierungsreaktion und Epoxidbildung deutlich dokumentiert. Vitamin K-2,3-Epoxid wird anschließend zu reduziertem Vitamin KH_2 (Hydrochinon) zurückgebildet (mit Hilfe von Vitamin K-Epoxid-Reduktase).



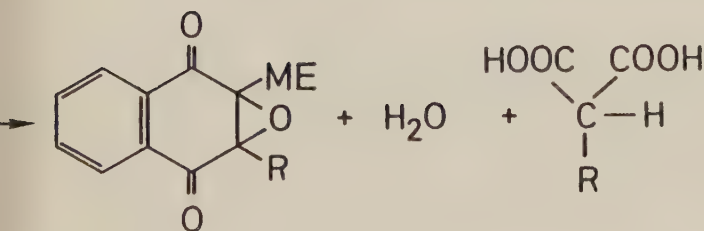
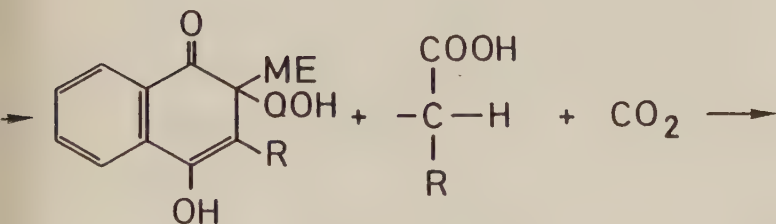
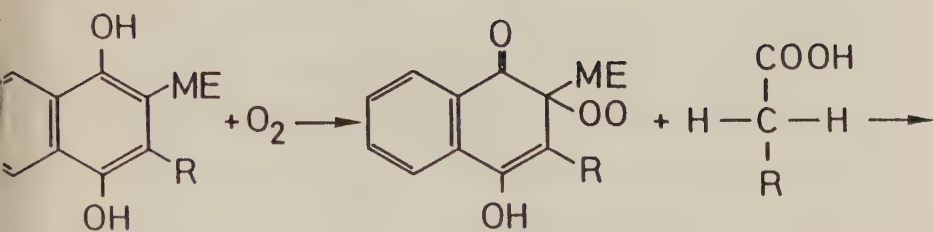
Vit. K - Epoxid-Reduktase

Daß Vitamin K abhängige Carboxylierung und Epoxidbildung eng zusammenhängen zeigt auch die Tatsache, daß beide am rauhen endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle ausgeführt werden. Beide Reaktionen verwenden als Substrat Vitamin KH_2 (Hydrochinon).

Bei obiger Reaktionsgleichung tritt als Zwischenprodukt ein Hydroxyperoxid auf, das aus Vitamin K geformt wird. Dieses ist in der Lage dem Kohlenstoffatom der Glutaminsäure ein Proton zu entreißen und dadurch ein Carbanion zu bilden.

Das protonisierte Zwischenprodukt tritt nun mit CO_2 und dem Carbanion zu Vitamin K-2, 3-Epoxid, γ -Carboxyglutaminsäure und H_2O zusammen.

Reaktionsgleichung:



Ob das Proton tatsächlich von der Glutaminsäure abgespalten wird oder nur aktiviert wird, bleibt für weitere Arbeiten offen.

Vitamin K greift jedoch nicht nur in die Bildung der Gerinnungsfaktoren ein. Neuere Untersuchungen (Olson, 1984) zeigen, daß Vitamin K abhängige γ -Carboxyglutaminsäurereste (Gla) auch in Proteinen anderer Organe zu finden sind. An erster Stelle sei hier das Osteocalcin (Bone-Gla-Protein = BGP) genannt. Es ist aus 49 Aminosäuren zusammengesetzt mit drei Gla-Resten. Die Wirkungsweise von BGP ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt (Olson 1982). Zwei Hypothesen wurden diskutiert:

- a) Hauschka (1979) zeigte die Mitwirkung des Osteocalcins an der Knochenmineralisation
- b) Price et al (1976) hingegen erkannten das BGP als potentiellen Inhibitor der Hydroxyapatitkristallisation.

Gla-Reste wurden auch in Proteinen der Niere, der Milz, der Lunge und der Placenta gefunden. Nähere Untersuchungsergebnisse liegen hier noch nicht vor.

Anhand neuerer Forschungsarbeiten an warfarin-resistenten Ratten (Olson 1983) wurde ein neues Zwischenprodukt im Epoxidzyklus nachgewiesen. Wird Vitamin-K-Epoxid mit Mikrosomenpräparationen von warfarinresistenten Ratten inkubiert, tritt Hydroxyvitamin K auf. Es wurde angenommen, daß dieses aus einem allgemeinen Zwischenprodukt (nicht näher identifiziert) im Epoxidzyklus entsteht. Fasco et al (1983) vertraten überzeugend die Meinung, daß Hydroxyvitamin-K in Wirklichkeit ein Produkt einer veränderten Vitamin K-Epoxid-Reduktase ist. Das allgemeine Zwischenprodukt stellt die Enolatform dar, welche bei der Reaktion des Epoxids mit einer Sulfhydrylgruppe der Reduktase entsteht. Während Mikrosomenpräparationen von normalen Ratten dieses oben genannte Zwischenprodukt zu Vitamin-K-Quinon und Wasser umwandeln, entläßt die Reduktase von warfarinresistenten Tieren teilweise die

freie Enolform, welche sofort und nicht enzymatisch sich als Hydroxyvitamin-K stabilisiert.

Diese Vorstellung einer Sulfhydrylaktivität von einigen beteiligten Enzymen führte (Olson 1984) zu folgendem Verständnis des Reaktionsablaufes der γ -Carboxylierung und des Epoxidzykluses (dargestellt in Abbildung 1, Seite 19).

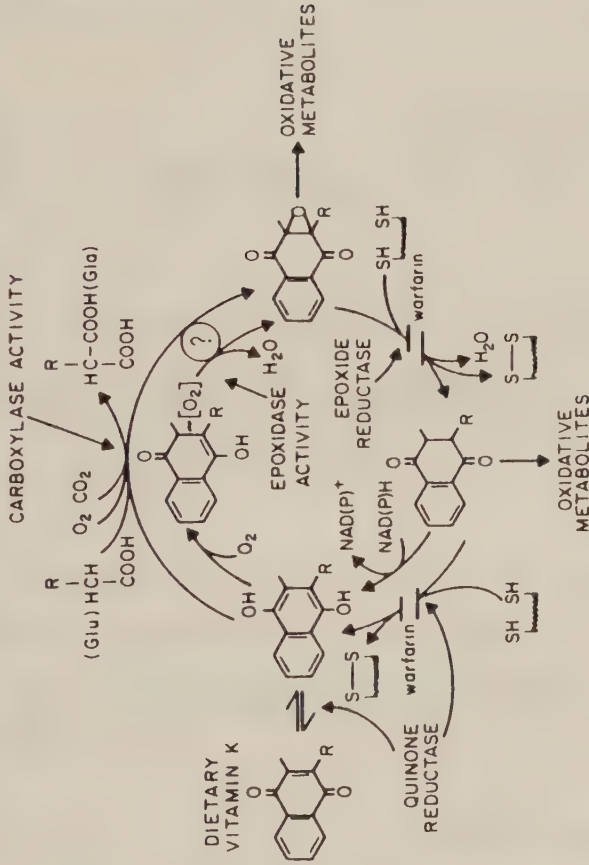
2.2 Vitamin K Formen

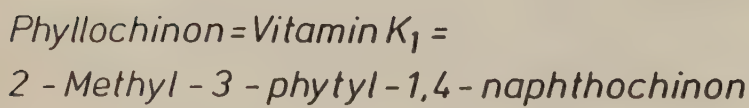
2.2.1 Natürlich vorkommende Vitamin K Formen

(Harris 1971)

Das Vitamin K₁ (Phyllochinon) hat eine einfach ungesättigte Seitenkette mit 20 Kohlenstoffatomen (Phytyl-Seitenkette). Es kommt in grünen Pflanzengewebe vor. Teile von Pflanzen, die normalerweise kein Chlorophyll enthalten, haben auch wenig Vitamin K. Dagegen können gelb gefärbte Blatteile genausoviel Vitamin K enthalten wie grüne.

Abb. 1: Reaktionsablauf: γ -Carboxylierung und Epoxidzyklus



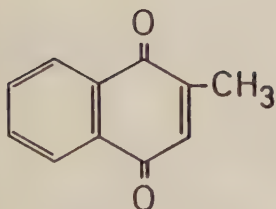
Cc1cc(=O)c2ccc(cc12)C(=O)/C=C/C(C)=CC=CCCC=CCC(C)=CC

Menachinon-7 (MK-7)=
2-Methyl-3-(all-trans-farnesyl-geranyl-geranyl)-1,4-naphthochinon

2.2.2 Künstlich hergestellte Vitamin K Formen

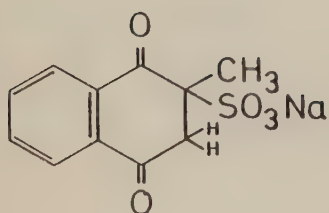
Menadion (Vitamin K₃) ist ein synthetisches Produkt.

Es ist fettlöslich, während seine Derivate meist wasserlöslich sind.

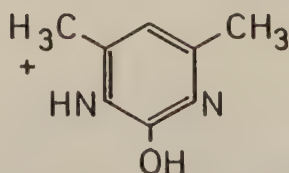
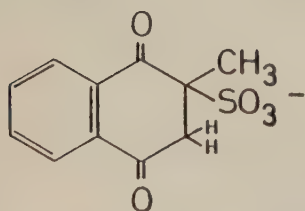


Menadion = 2-Methyl-1,4-naphthochinon

Die heute vorwiegend und routinemäßig für die Ergänzung von Mischfuttermitteln verwendeten Vitamin K wirksamen Substanzen, leiten sich vom Menadion ab.

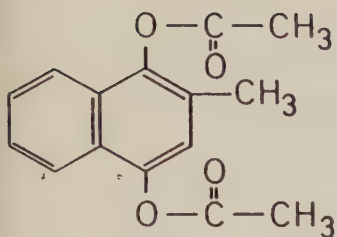


Menadion - Natrium - Bisulfit (MSB)

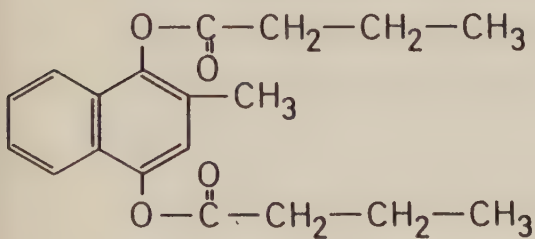


Menadion - Dimethyl - Pyrimidinol - Bisulfit (MPB)

Die Menadiol-Derivate sind bekannt, werden
aber nur vereinzelt für die Mischfutterer-
gänzung eingesetzt.



Menadioldiacetat



Menadioldibutyrat

2.3 Resorption von verschiedenen Vitamin K

Formen aus dem Darm

2.3.1 Vitamin K₁ (Phyllochinon) scheint durch einen aktiven, energieverbrauchenden Prozeß aus dem Dünndarm resorbiert zu werden (Hollander et al 1977). Beeinflußt wird dieser Prozeß von gleichzeitig vorhandenen Gallensäuren, kurz-, mittel- und langkettigen Fettsäuren, Monoglyceriden und Lecithinen. Menadion dagegen scheint von der Ratte im Dünndarm durch eine passive Diffusion aufgenommen zu werden.

2.3.2 Die Menaquinone werden im Dickdarm bzw. im Endstück des Dünndarmes resorbiert. Dieser Transport scheint ebenfalls unabhängig von Energie zu sein (auch ohne Carrier-Moleküle) (Hollander et al 1976).

Menaquinone sind bakteriellen Ursprungs. Die von der Darmflora produzierten Formen sollen nach dem oben angegebenen Mechanismus resorbiert werden. Doisy (1971) wies darauf hin, daß die vollkommene Elimination von Vitamin K aus der Nahrung beim Menschen keine Mangelsymptome auslöst.

2.4 Toxizität von Vitamin K (nach Barash, 1978)

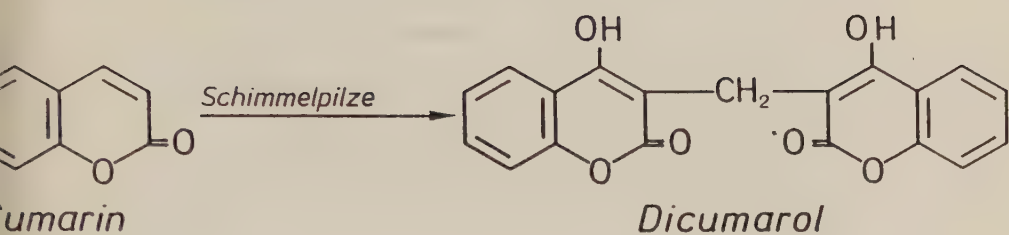
Die toxischen Haupteffekte von Vitamin K manifestieren sich als hämatologische Effekte und als Kreislaufprobleme. Die verschiedenen Vitamin K Formen ziehen aber auch unterschiedliche toxische Folgen nach sich. Phyllochinon zum Beispiel führte bei Einnahme von massiv hohen Dosen (25 g/kg Lebendmasse) zu keinen toxischen Ereignissen, während Menadion bei Mäusen eine LD₅₀ von 500 mg/kg Lebendmasse aufwies. Studien an Katzen, Hunden und Affen zeigten, daß kleine Dosen Menadion (5 mg/kg Lebendmasse) eine leichte Anämie ohne pathologische Folgezustände nach sich zogen. Mit oralen Dosen von 25 bis 50 mg/kg Lebendmasse zeigten sich jedoch Anämie, Hämoglobinurie und Urobilinurie. Mäuse, die mit letalen Dosen von Menadion behandelt wurden, zeigten Tränenfluß, Exophthalmus und Konvulsionen, die zu einer respiratorischen Paralyse und damit zum Tode führten. Dauernde Verabreichungen von hohen, aber nicht letalen Dosen von Menadion an Hunde, führten zu Cyanose und Methämoglobinämie. Zusätzlich konnten Hyperprothrombinämie,

Leber- und Nierenschäden gesehen werden. Diese manifestierten sich als Hepatomegalie (fettige Infiltration) und Hämosiderose.

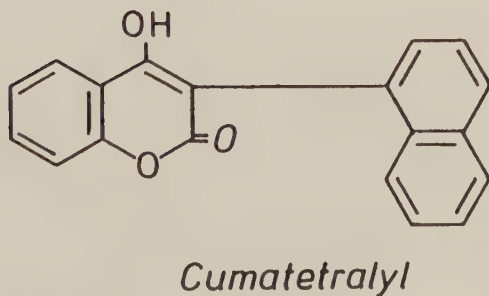
Die Haupttoxizität von Vitamin K beim Menschen ist offensichtlich die Wirkung auf Herz und Lunge (Dyspnoe, Brustschmerzen, Cardiovas-kulärer Kollaps). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß diese Effekte oftmals auf das Lösungsmittel des betreffenden Vitamin K Präparates zurückzuführen waren.

2.5 Vitamin K Antagonisten

Der bekannteste Vitamin K Antagonist ist das Dicumarol. Es wurde von Link und Campbell (1941) entdeckt, die es als indirektes Antikoagulantium bezeichneten, da es der Wirkung von Vitamin K entgegensteht. Dicumarol wird in gewissen Steinkleearten unter dem Einfluß von Schimmelpilzen aus Cumarin gebildet.



Von einer Vielzahl an synthetischen Vitamin K Antagonisten sei hier nur das Cumatetralyl genannt.



Nachdem man früher angenommen hatte, daß diese Antikoagulantien das Vitamin K von seinem Wirkort verdrängen (kompetitive Hemmung) (Perlik 1964), weiß man heute, daß verschiedene Enzyme, die an der Bildung der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren beteiligt sind (siehe 2.1.2), gehemmt werden.

Andere chemische Gruppen sind ebenfalls als Vitamin K Antagonisten erkannt worden. Hierher gehören die Indandione und bestimmte Naphthochinonderivate. Auch unter den Antibiotika sind Vitamin K Hemmer bekannt (Suttie 1970). So zum Beispiel das Cycloheximid oder das Puromycin. Ein weiteres wichtiges Beispiel stellen die Sulfonamide dar (Sweet et al 1954). Wenn man in Rechnung stellt, daß heute Sulfonamide und deren Derivate als Coccidiostatika in Geflügelrationen einge-mischt werden und man weiß, daß diese als Vitamin K Antagonisten fungieren, so wird verständlich, daß gerade im Geflügelfutter der Vitamin K Ergänzungsbedarf um ein Vielfaches steigen kann.

2.6 Biologische Tests für Vitamin K

2.6.1 Allgemeines

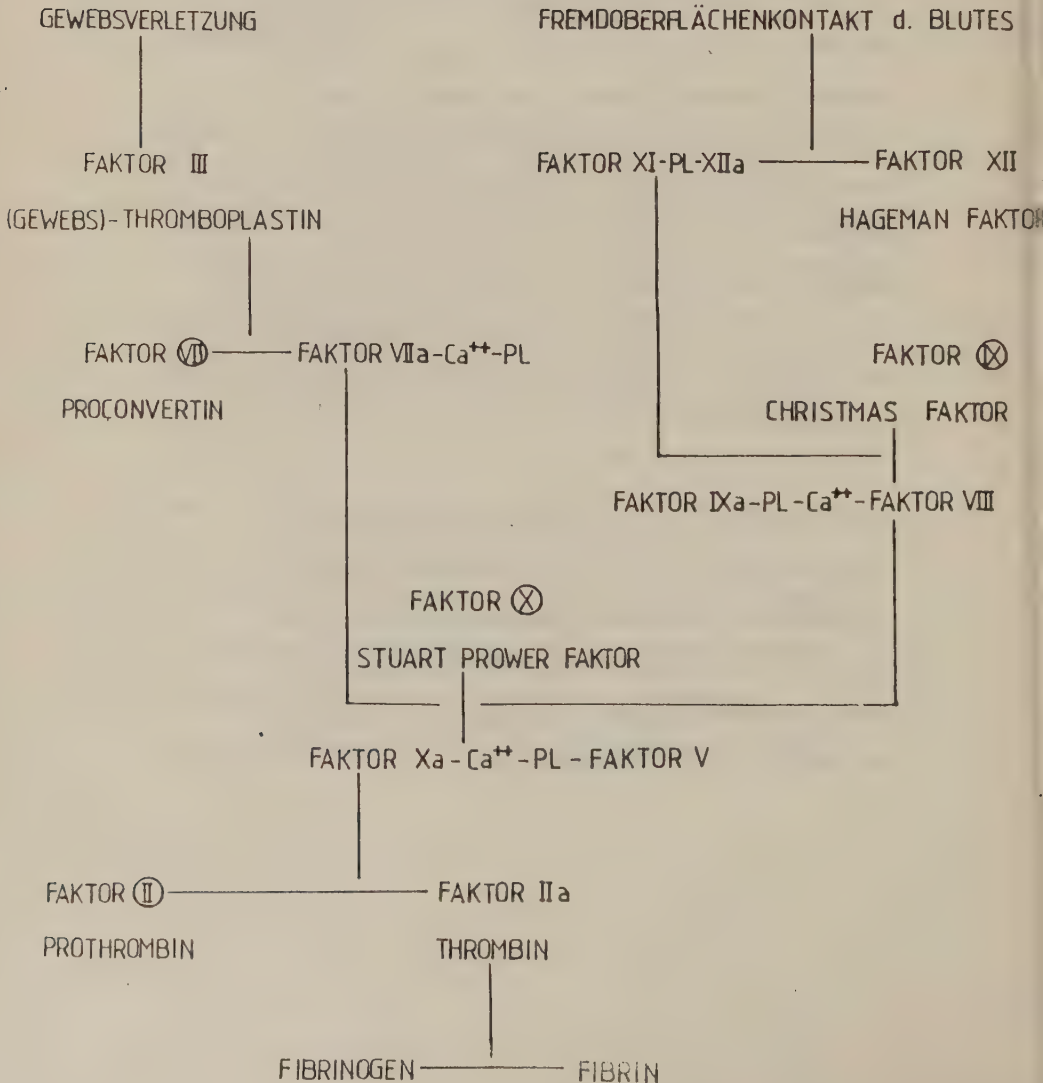
Alle biologischen Bestimmungsmethoden basieren auf der Wirkung von Vitamin K im Blutgerinnungsablauf. Durch einen, wie auch immer erzeugten Vitamin K Mangel können jene Blutgerinnungsfaktoren, die von Vitamin K abhängig sind (II, VII, IX und X), nicht mehr ausreichend gebildet werden. Die Folge davon ist eine meßbare Verlängerung der normalen Blutgerinnungszeit. Die Darstellung des Blutgerinnungsablaufs ist in Abbildung 2 dargestellt (nach Heimbürger, N. und Trobisch, H. 1971).

Die mit a bezeichneten Faktoren stellen die "aktivierte" Form der im Plasma oder Gewebe vorhandenen "inaktiven" Bestandteile dar. Die mit einem Kreis umrandeten Faktoren sind in ihrer Synthese Vitamin K abhängig. PL steht als Abkürzung für Phospholipide.

Abbildung 2: Ablauf der Blutgerinnung

EXOGENES SYSTEM

ENDOGENES SYSTEM



Die Einleitung der Gerinnung kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen geht sie von einer Gewebsverletzung aus und läuft über das exogene System (=extrinsic system) ab. Das initiale Ereignis ist die Freisetzung von chemisch verschiedenen gerinnungsaktiven Substanzen aus Zellen des verletzten Gewebes. Man faßt sie unter dem Begriff Gewebsthromboplastin oder Gewebsthrombokinas (Faktor III) zusammen. Die zweite Möglichkeit ist mit dem endogenen System (=intrinsic system) gegeben. Es wird in Gang gesetzt, sobald Blut mit fremden Oberflächen in Kontakt kommt. Dabei verbindet sich der aktivierte Faktor XII a mit Faktor XI (=Plasma Thromboplastin Antecedent, PTA). Beide Systeme laufen dann - über verschiedene Zwischenstufen - kaskadenförmig ab und führen zur Aktivierung des Faktors X (Prothrombinaktivator). Dieser bewirkt dann in Verbindung mit Ca^{++} - Ionen und Phospholipiden die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

Letzteres katalysiert die wesentliche Reaktion des Gerinnungsvorganges, die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. Damit ist die eigentliche Gerinnung beendet, das Gerinnsel gebildet.

Es ist zu erkennen, daß im Ablauf des Blutgerinnungsvorganges sehr viele Faktoren beteiligt sind, die nicht vom Vitamin K abhängig sind. Interessant sind aber bei Vitamin K Mangeltieren gerade jene Faktoren. Es scheint daher zweckmäßig, bei der Ermittlung der Blutgerinnungszeit eine Teilreaktion des Gerinnungssystems zu wählen, an der möglichst viele Vitamin K abhängige und möglichst wenige Vitamin K unabhängige Faktoren beteiligt sind. Diese Forderungen erfüllt die von Quick 1935 ermittelte "Einstufenprothrombinzeitbestimmung". Dabei werden die bekannten Faktoren (Ca^{++} - Ionen und Thromboplastin) im Überschuß dem Ansatz zugegeben. Auf die Prothrombinzeit haben Thrombokinase (=Thromboplastin), Ca^{++} - Ionen, die Faktoren VII, X und V, und Prothrombin (Faktor II) Einfluß. Es werden also bei dieser Methode der

Gerinnungszeitbestimmung drei der vier Vitamin K abhängigen Bestandteile erfaßt.

Die Zugabe von Thromboplastin ist ein wichtiges Element im Quick'schen Modell. Aber gerade hier ergeben sich Schwierigkeiten hinsichtlich der Herstellung bzw Gewinnung dieser Substanz. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß homologes Thromboplastin (=Thromboplastin, hergestellt von der gleichen Spezies, von der die Gerinnungszeit ermittelt werden soll) bessere Ergebnisse liefert. Thromboplastin hergestellt aus Hirnmaterial ist günstiger als das aus Muskel-, Lungen- oder Embryonalgewebe. Trotzdem wußte man aber nicht, inwieweit sich die Blutgerinnungszeiten verhielten, wenn Hirnmaterial von verschieden alten Individuen gewonnen wurde. Bis dato - auch in dieser Arbeit - wurde für entsprechende Kükenversuche Hirnmaterial von Eintagsküken zur Herstellung von Thromboplastin verwendet. Es zeigte sich aber (Doerr et al 1975), daß die Thromboplastinzeiten von Versuchsküken konstant

blieben, falls Hirnsubstanz von bis zu vier Wochen alten Spenderküken gewonnen wurde. Bei über vier Wochen alten Küken verlängerten sich die Thromboplastinzeiten der Probanden zum Teil erheblich.

2.6.1.1 Besonderheiten beim Huhn

Das Gerinnungspotential des Hühnerplasmas ist geringer als das von anderen Tierarten (Walz et al 1975). Hingegen verfügt das Huhn über eine ausgesprochen hohe Gewebsthrombokinasaktivität (Dorn 1965). Weiterhin wurde ermittelt, daß die Faktoren XII, X und IX in geringerem Maße im Plasma vorhanden sind, verglichen mit Ratten-, Menschen-, oder Rinderplasma. Faktor VII scheint es im Hühnerplasma nicht oder nur in Spuren zu geben. Prothrombin scheint der Hauptfaktor der Blutgerinnung zu sein. 1974 gelang erstmals der sichere Nachweis von Prothrombin aus Hühnerplasma (Olson 1974). Es weist ein Molekulargewicht von 70.000 auf und hat eine geringere spezifische Aktivität als die anderer Spezies.

2.6.2 Die kurative Testmethode

Nahezu alle biologischen Tests für Vitamin K werden mit Küken durchgeführt. Küken eignen sich sehr gut, da ihre anatomischen Verhältnisse eine schnelle Vitamin K Unterversorgung gewährleisten. Zum einen liegt das in der Kürze des Verdauungstraktes (kurze Resorptionsstrecke für sämtliche Formen von Vitamin K (Maynard et al 1979) begründet. Zum anderen deckt das Huhn seinen Bedarf an Vitamin K vor allen Dingen durch Koprophagie. Dies wird durch die moderne Haltung auf Gitterrosten verhindert.

In diesem speziellen Verfahren wird an die Versuchstiere eine Vitamin K arme Diät verfüttert (Dam 1938). Dies wird solange durchgeführt, bis eine deutlich meßbare Verlängerung der Blutgerinnungszeit eingetreten ist. Gibt man oral Vitamin K-Produkte und ermittelt nach einer Zeitspanne von etwa 24 h die Gerinnungszeiten, so kann anhand dieser Werte ein Aktivitätsvergleich der Substanzen bzw. Substanzmengen angestellt werden. Jedoch verlangt dieser Test offensichtlich höhere Anforderungen an die technische Ausführung als andere Methoden (Weiser und Kormann 1983).

2.6.3 Prophylaktisches Testverfahren

In diesem Verfahren werden einer Vitamin K armen Diät verschiedene Vitamin K Produkte in unterschiedlichen Dosierungen beigemischt. Diese Rationen werden dann an Küken verfüttert (Griminger 1965). Nach einigen Tagen werden die Gerinnungszeiten gemessen (mehrmals hintereinander). Durch den Vergleich der Resultate bezogen auf die Dosierungen der Vitamin K Substanzen kann man Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des Präparates ziehen.

Um eine größere Sensibilität zu erreichen, können - sowohl beim kurativen als auch beim prophylaktischen Testverfahren - zu der Vitamin K armen Diät in geringen Dosierungen Antikoagulantien beigemischt werden.

Der Test, welcher der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt, greift sowohl auf Elemente der kurativen als auch auf solche der prophylaktischen Testmethode zurück. Den hier verwendeten Küken

wird zu Beginn der Untersuchung eine Vitamin K arme Diät angeboten, welche mit geringen Mengen eines Antikoagulantiums (hier Cumatetralyl) versetzt ist. Diese Periode dauert drei Wochen. Auf diese Weise werden am Ende dieser Vorperiode verlängerte Blutgerinnungszeiten angetroffen. Ab jetzt - in der sogenannten Hauptphase - werden die Testrationen mit verschiedenen Dosierungen der Vitamin K Produkte verfüttert. Gleichzeitig ist auch hier Cumatetralyl (in höherer Dosierung) in die Futterrationen eingebracht.

Von einigen Autoren (Weiser, und Kormann 1983). 1983) wurden für diese Methode spezielle Nachteile genannt. Zum einen bestimmt die dauernde Verabreichung von Vitamin K Produkten zusammen mit den verwendeten Antikoagulantien im Grunde genommen nur die Wechselwirkung der Vitamin K Komponente mit dem Anagonisten. Zum anderen kann die Aussagefähigkeit des Test unzureichend sein, da nur sehr flache Regressionsgeraden erreicht werden können. Diese Feststellungen - im speziellen die letztgenannte - konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Mit früheren Arbeiten (Bomhard et al 1975; Gropp et al 1975; Schulz et al 1975) konnte ein modifiziertes Verfahren zur biologischen Vitamin K Testung vorgestellt werden. Dabei stellte sich die Verwendung von schnellwachsenden männlichen Broilerküken als vorteilhaft heraus. Bei diesen Tieren kann schneller mit einer Vitamin K Depletion gerechnet werden. Außerdem wird ein für den Versuch relevantes Körpergewicht (ca. 400 g) eher erreicht, als dies zum Beispiel bei Tieren einer Legerasse der Fall ist.

In eigenen Voruntersuchungen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wurde die Blutentnahme erprobt. Ein Vergleich zwischen Blut aus der Vena jugularis und der Flügelvene ergab, bei gleichen Individuen, unterschiedliche Blutgerinnungszeiten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß im Bereich des Halses bei Broiler-

küken sehr viel mehr Gewebe über der Jugular-vene liegt, als dies bei der Flügelvene zu beobachten ist. Daraus wird der Schluß gezogen, daß die "Verunreinigung" des Blutes mit der beim Geflügel hochwirksamen Gewebsthrombokinase bei Blutentnahme aus der Vena jugularis größer ist, als wenn Blut aus der Flügelvene entnommen wird. Die Punktion der Flügelvene ist im Gewichtsbereich ab etwa 300 - 400 g Körpergewicht relativ einfach vorzunehmen.

In oben zitierten Arbeiten konnte weiterhin gezeigt werden, daß Cumatetralyl (CT) als Depletionshilfe die bestgeeignetste Substanz darstellt. Deshalb wurde in allen Versuchen dieser Vitamin K-Antagonist verwendet. Bei einer Konzentration von 10 bzw. 15 ppm CT und einer Vitamin K Dosierung von 30 bis 120 ppb bewegte sich die Dosis-Wirkungskurve innerhalb der steilsten Steigung.

Als Hauptversuchskriterium diente die Thromboplastinzeitbestimmung nach Quick. Verwendet

wurde dabei homologe Thrombokinasen, hergestellt aus Eintagskükengehirnen. Es erwies sich als unvorteilhaft heterologes Thromboplastin zu verwenden, da hiermit uneinheitliche Thromboplastinzeiten erzielt wurden.

3.1 Methodik

In allen vier Versuchen erhielten Vitamin K depletierte männliche Broilerküken nach einer dreiwöchigen Vorperiode, in welcher eine Vitamin K arme Basalration mit 1ppm CT zum ad libitum Verzehr angeboten wurde, dieselbe Futtermischung mit unterschiedlichen Vitamin K Konzentrationen. In den Versuchen 1 bis 3 wurden gleichzeitig 15ppm CT in die Rationen eingemischt, während in Versuch 4 die Depletionswirkung von 10ppm CT mit der höheren Konzentration verglichen wurde.

Die Wirkung von Vitamin K und CT wurde anhand der Thromboplastinzeiten bestimmt.

Die allen Versuchen gemeinsam zugrunde gelegten Methoden werden in folgenden Abschnitten beschrieben.

3.1.1 Tiermaterial

Aufgestallt wurden in allen Fällen männliche Eintagsbroilerküken (B975 Lohmann). Nach der Vorperiode konnte eine routinemäßige Blutentnahme durchgeführt werden, und mit der Fütterung der verschiedenen Vitamin K Testrationen begonnen werden. Nach einer 4-5tägigen Gewöhnungsphase wurde dann zum ersten Mal Blut von den Tieren entnommen.

3.1.2 Fütterung

Die Zusammensetzung des Vitamin K armen Futters ist aus Tabelle 1 ersichtlich. In der Vorperiode war dieser Basalration 1 ppm CT beige-mischt, während in der Versuchsperiode wechselnde Konzentrationen der Vitamin K Testsubstanzen und 15 ppm bzw. 10 ppm CT in Versuch 4 beige-mengt waren. Die Fütterung erfolgte immer zum ad libitum Verzehr.

Tabelle 1: Vitamin-K-arme Basisration ¹⁾
(Komponenten in Prozent)

Komponenten	%
Sojafeinmehl	40,5
Maisschrot	20,0
Sojaöl	2,0
Sirona (Maisstärke)	33,5
Ca $\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5
Ca CO_3	0,5
Na Cl	0,4
Vitamin Vormischung ²⁾	0,5
Spurenelementvormischung ³⁾	0,1
	100,0

1) Die verschiedenen Vitamin K-Präparate und Cumatetralyl wurden im Versuchsfutter als Vormischungen auf Sojafeinmehlbasis zu Lasten von Sojafeinmehl in die Basisration eingemischt.

2) Vitamin Vormischung (auf Sojafeinmehlbasis) enthielt in 5 g auf 1 kg Futter:

Retinol 10 mg, Cholecalciferol 1,4 mg, α -DL-Tocopherolacetat 10 mg, Riboflavin 3 mg, Cobalamin 10 mcg, Ca-Pantothenat 5 mg, Nikotinsäure 25 mg, Cholinchlorid 200 mg, DL-Methionin 2 g, Glycin 1,2 g.

- 3) Spurenelementvormischung (auf Maisstärkebasis)
enthielt in 1 g auf 1 kg Futter:

Fe (aus Eisenfumarat) 101 mg, Zn (aus Zinkacetat)
80 mg, Mn (aus Mangansulfat) 80 mg, Cu (aus Kupfer-
acetat) 12 mg, J (aus Kaliumjodid) 2,5 mg, Co (aus
Cobaltsulfat) 1 mg, Se (aus Natriumselenit) 0,5 mg,
F (aus Natriumfluorid) 5 mg, Mg (aus Magnesiumoxid)
70 mg.

3.1.2.1 Herstellung der Rationen

Zum Herstellen der Rationen standen ein 100 kg-Mischer, ein 20 kg, ein 8 kg und ein 500 g Mischer zur Verfügung. Die Vitamin K Produkte wurden auf Sojafeinmehlbasis zuerst im 500 g-Mischer verteilt. Dieses Verfahren gewährleistete eine homogene Verteilung des Vitamins in der sogenannten Vormischung I. Diese wurde dann zusammen mit der Cumatetralyl-Menge im 8 kg-Mischer weiter mit Sojafeinmehl vermengt. Die entstehende Vormischung II (Cumatetralyl und Vitamin K) konnte dann im 100 kg-Mischer bzw. im 20 kg-Mischer mit den übrigen Futterkomponenten zur Endration zusammengestellt werden.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die jeweilige Cumatetralyl-Menge und die verschiedenen Vitamin K Produkte in einer Vormischung zusammenzustellen, da hier angenommen werden kann, daß beide Substanzen homogen untereinander verteilt werden. Eine größere Menge an Vormischung gewährleistet anschließend bei der Fertigstellung der Rationen im großen Mischer eine gleichmäßigere Verteilung über die Restkomponenten des Futters.

3.1.3 Haltung der Versuchstiere

Die Versuche 1 und 2 wurden in einem Stall mit 24 Käfigeinheiten durchgeführt, welcher mit elektrisch betriebenen Heizkörpern erwärmt werden konnte. Die Versuche 3 und 4 konnten in einem mit einem Ölofen beheizten Stallteil mit 104 Käfigeinheiten ausgeführt werden.

In beiden Ställen waren die Käfige mit einem großmaschigen Drahtboden versehen, um die Möglichkeit der Koprophagie zu verringern. Selbsttränken und Futtertröge waren an der Vorderfront der Käfige angebracht, um eventuelle Kotreste leicht entfernen zu können. Es wurde außerdem darauf geachtet, daß der Drahtboden in regelmäßigen Abständen gereinigt wurde. Die Tiere erhielten in Versuch I u. II im abgedunkelten Stall 24 Stunden Dauerlicht.

3.1.4 Thromboplastinzeitbestimmung

Zur Ermittlung der Gerinnungszeiten stand das Coagulometer nach Schnitger und Gross (Typ 410 A 4 B) der Firma Amelung in Lemgo zur Verfügung. Dieses Coagulometer arbeitet nach der

Häkchen-Methode, das heißt der Gerinnungszeitpunkt wird dadurch ermittelt, daß ein in regelmäßigen und kurzen Zeitabständen durch den Gerinnungsansatz gezogenes Häkchen im Augenblick der Gerinnung ein Fibrinfädchen aus der Flüssigkeit herauszieht. Das Fibrinfädchen bildet eine elektrisch leitende Verbindung zwischen der im Gerinnungsansatz stehenden Stabelektrode und der herausgehobenen Häkchen-elektrode. Eine nachgeschaltete Elektronik registriert die leitende Verbindung zwischen den beiden Elektroden und schaltet Zeitzähler und Häkelantrieb aus. Die Teströhrchen aus Kunststoff und Reagenzien werden durch die eingebaute Heizung mit Thermostatkontrolle konstant auf 37°C erwärmt (anonym).

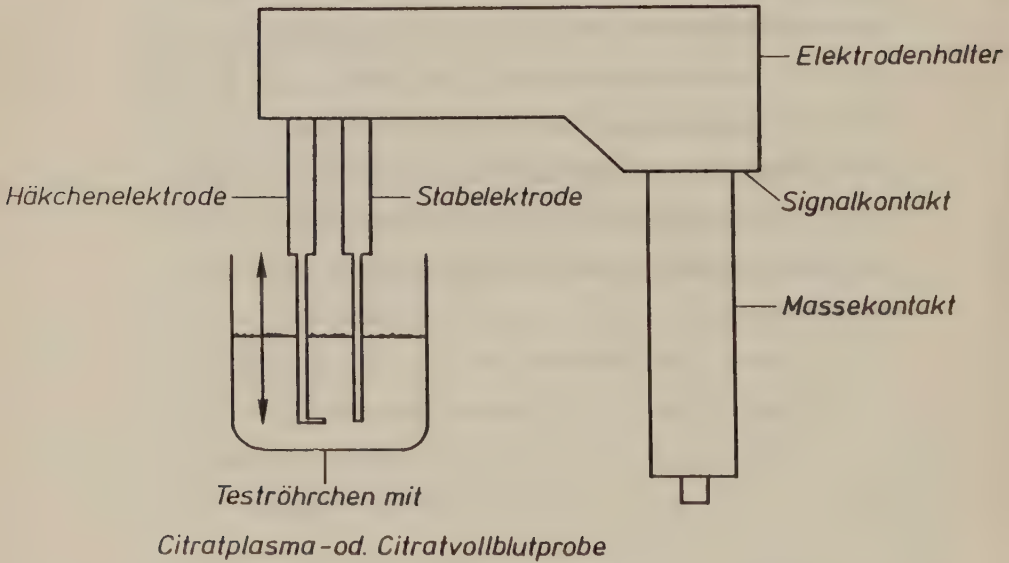
Da aber die normale Körpertemperatur des Huhnes höher liegt ($40,5^{\circ}\text{C}$ - 42°C), wurde versucht, die Thermostatkontrolle höher einzustellen. Laut Herstellerfirma ist dies nur sehr schwer möglich. Trotzdem konnte ein Gerät geliefert werden, bei welchem eine Temperatur des Vorwärmeblocks von konstant $40,0^{\circ}\text{C}$ erreicht werden konnte. Es ist wichtig, die Thromboplastinzeiten

nahe der physiologischen Körpertemperatur zu messen, da andernfalls erhebliche Abweichungen auftreten können.

Das Ansatzvolumen ist durch verstellbare Einsätze im Vorwärmblock von 200 bis 600 μ l einstellbar.

Nach dem Vorwärmen der Vollblut - oder Plasma-
probe erfolgt durch Betätigen einer automatischen
Pipette die Zeitmessung und durch Einsetzen
der Elektrodenhalter in die Meßstellen der
Häkelvorgang.

Abb.3: Veranschaulichung der Funktion



Zum Erwärmen der Reagenzien dürfen nur Glasröhrchen verwendet werden, die genau in die Bohrungen des Thermostatenblocks passen, damit ein einwandfreier Wärmefluß gewährleistet wird. Die Vorwärmzeiten hängen von der zu erwärmenden Flüssigkeitsmenge ab (sie wurden gemäß Anleitung eingestellt). Die Kunststoffröhrchen werden nur als Teströhrchen verwendet und nicht zum Vorwärmen von Reagenzien, da sie eine schlechte Wärmeleitfähigkeit besitzen.

3.1.4.1 Handhabung des Gerätes

Abweichend von der in der Betriebsanleitung vorgeschlagenen Handhabungsweise wurde in dieser Arbeit wie folgt vorgegangen (nach 10-minütiger Vorwärmphase bis zur Betriebsbereitschaft des Gerätes):

- a) Etwa 3 ml Thromboplastinlösung wurden in ein geeignetes Glasröhrchen eingebracht und in eine der großen Bohrungen des Thermostatenblocks gesteckt (mindestens 7 Min. Anwärmzeit).

- b) Desgleichen wurde mit der 0,025 molaren CaCl_2 -Lösung verfahren.
- c) Maximal vier Citratplasma Proben, von denen die Thromboplastinzeit bestimmt werden sollte, wurden ebenfalls in Glasröhrchen einpipettiert und in die kleinen Bohrungen verbracht (je nach Menge vorwärmen, zum Beispiel: 1 ml Citratplasma 6 min vorwärmen).
- d) Kurz vor Beendigung der Anwärmphase für das Citratplasma wurden in vier Kunststoffröhrchen jeweils 0,1 ml CaCl_2 -Lösung und 0,1 ml Thromboplastin einpipettiert. Die Kunststoffröhrchen müssen vorher mindestens 3 min in den kleinen Bohrungen des Thermostatenblocks des Coagulometers vorgewärmt worden sein. Anschließend wurden die mit 0,025 molaren CaCl_2 -Lösung und Thromboplastin gefüllten Teströhrchen in die jeweiligen Bohrungen der Meßstellen verbracht (die verstellbaren Einsätze der Meßstellen waren auf 300 μl eingestellt).

e) Jetzt konnte (nach Beendigung der Vorwärmzeit) mit der automatischen Pipette jeweils 0,1 ml aus den Glasröhrchen - gefüllt mit den jeweiligen Citratplasma-proben - entnommen und schnell dem Teströhrchen zugesetzt werden. Ab hier begann das Gerät die Gerinnungszeit zu messen. Nach kurzem Schwenken des Teströhrchens zum Zwecke der besseren Mischung des Gerinnungsansatzes wurden die Elektrodenhalter in die Meßstellen eingesetzt und der Häkelyorgang begann.

Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, daß jede Plasmaprobe zu etwa gleichen Zeiten gemessen wird. Der Vorgang des Einpipettierens des Citratplasmas konnte relativ schnell erfolgen und so bestand zwischen erster und vierter Probe eine maximale Zeitdifferenz von ca. 45 sec. Andere Verfahren erwiesen sich als zeitaufwendiger und hatten auch negative Auswirkungen auf die Wiederholbarkeit der Thromboplastinzeiten der Proben. War nämlich die Zeitspanne zwischen Gerinnungsanfang der 1.

Probe und Gerinnungsbeginn der 4. Probe zu groß - die Vorwärmzeit für Probe 4 wurde demnach zu lang - so mußte damit gerechnet werden, daß Vitamin K abhängige Faktoren in meßbarer Anzahl bereits zerfallen und dadurch nicht mehr biologisch aktiv waren.

Weiterhin muß ein genaues Arbeiten gefordert werden. Es ist für die Ermittlung der Thromboplastinzeit sehr nachteilig, wenn ein Teil des zugegebenen Citratplasmas an der Wand des Teströhrchens "hängenbleibt". Es erwies sich als vorteilhaft, die Automatik-Pipette senkrecht in das Teströhrchen einzuführen und die Pipettenspitze fest an die Innenwandung anzudrücken und dann erst die Citratplasmaprobe zu entleeren. Dadurch wurde gewährleistet, daß die gesamte Plasmaprobe (0,1 ml) in das Calcium-/Thromboplastingemisch überführt wurde.

3.1.4.2 Arbeitsablauf während eines Versuchstages

Nach Entnahme der ersten vier Blutproben wurden diese zehn Minuten lang zentrifugiert. Während dieser Zeit konnten die nächsten vier Blutproben entnommen werden. Voraussetzung dafür war, daß ein Helfer vorher bereits alle vier Küken aus den entsprechenden Käfigen entnommen hatte und diese (markiert) für die Blutentnahme bereitstanden. In der Zwischenzeit waren die zuerst entnommenen Proben "fertig" zentrifugiert. Das entstandene Citratplasma konnte in Glasröhrchen abpipettiert werden und in den Thermo-
statenblock des vorbereiteten Coagulometers (bestückt mit Glasröhrchen für Thromboplastin und Calciumchlorid, acht Teströhrchen) zum Anwärmen verbracht werden. Gleichzeitig wurden die an zweiter Stelle entnommenen Proben zentrifugiert.

Nach Ablauf der Vorwärmfrist für die ersten vier Proben konnte der Häkelvorgang beginnen. Während der Messung wurden bereits die zweiten

vier Proben abzentrifugiert, in Glasröhrchen überführt und in die freigewordenen Bohrungen des Thermostatenblocks zum Anwärmen verbracht. Nach Ablesen und Notieren der Gerinnungszeit für die ersten vier Proben begann - nach Reinigung der Elektroden - die Messung des zweiten Probensatzes.

Auf diese Weise konnten pro Versuchstag bis zu 100 Citratplasma-proben von verschiedenen Individuen verarbeitet werden.

Zwischendurch war es notwendig Thromboplastin und Calciumchlorid in die entsprechenden Glasröhrchen nachzufüllen. Hier mußte jedoch stets die entsprechende Vorwärmphase nach der Neubestückung beachtet werden.

Es wird deutlich, daß es bei einer derart hohen Probenanzahl pro Tag nicht möglich ist, Doppelbestimmungen für jedes Citratplasma durchzuführen.'

3.1.5 Blutentnahmetechnik

Die Blutentnahme erfolgte nach der in dieser Arbeit eingeführten "TROPFENMETHODE".

Zur Blutentnahme wurden Einmalkanülen (TSK-Supra, Typ Luer) der Größe 0,6 x 25 mm (No 16) verwendet (Lanzettenschliff, Polypropylenansatz).

Bei der Blutentnahme wurde ein zuverlässiger Helfer benötigt, der das Tier auf die linke Körperseite legt und fixiert. Dabei hatte sich die Fixation der Ständer mit der linken Hand unter gleichzeitigem Festhalten des linken Flügels des Kükens bewährt. Der rechte Flügel wurde nach dorsal zurückgeschlagen und die Hilfsperson staute die Vena cutanea ulnaris des rechten Flügels. Jetzt konnte die Kanüle durch die Haut hindurch über dem Ellbogengelenk des Tieres eingestochen und anschließend in die gestaute Vene eingeführt werden. Die Kanüle wurde einige Millimeter in der Vene vorgeschoben,

wobei darauf zu achten war, daß die Innenwandung des Gefäßes nicht beschädigt wurde. Nach Verwerfen des 1. Bluttropfens wurden exakt 14 Blutropfen in einem Zentrifugenröhrchen aus Plastik (Saarstedt No 55463) aufgefangen.

In diesem Röhrchen befand sich 3,8 %-ige Natriumcitratlösung. Drei Tropfen des Gerinnungshemmers waren vorher mit einer Spritze (Einmalspritzen à 2 ml, Pharma Plast GmbH) in das Röhrchen verbracht worden. Es war hierbei darauf zu achten, daß beim Überführen der Natriumcitratlösung aus der Spritze in das Zentrifugenröhrchen immer der gleiche Druck auf den Stempel der Spritze ausgeübt wurde, sodaß immer exakt drei Tropfen in das Röhrchen gelangten. Für jede Versuchsperiode sollte nur eine einzige Spritze Verwendung finden.

Das aus der Kanüle abtropfende Blut wurde nun mit den so präparierten Röhrchen aufgefangen. Zur Einhaltung von standardisierten Bedingungen wurden im Plastikröhrchen genau 14 Tropfen Blut aus der Kanüle aufgefangen. Es war dabei

genau darauf zu achten, daß das abtropfende Blut nicht die Plastikwandung des Zentrifugenröhrchens berührt, sondern auf die vorgelegten drei Tropfen Natriumcitratlösung trifft.

Diese Methode stellte relativ hohe Anforderungen an Hilfspersonal und Ausführenden selbst. Der Helfer mußte beim Stauen des Gefäßes darauf achten, daß immer der gleiche Druck auf das Gefäß ausgeübt wurde. Wechselnder Staudruck konnte Folgen auf die Tropfengröße haben und damit das Prinzip der gleichen Bedingungen für jede Probe in Frage stellen. Gleicher Druck auf den Stempel der Spritze zum Befüllen der Zentrifugenröhrchen mit Natriumcitratlösung - wie erwähnt - ist aus demselben Grunde notwendig. Letzteres sollte daher immer von ein und derselben Person mit ein und derselben Spritze während der gesamten Versuchsdauer durchgeführt werden.

Die auf diese Weise gewonnenen Citratblutproben sollten sofort nach der Entnahme bei 3000 U/Min. 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Nach dem Zentrifugieren wurde das entstehende Citratplasma sofort mit Pasteurpipetten in Glasröhrchen überführt und zum Vorwärmen in den Thermostatenblock des Coagulometers verbracht. Sollten Proben aus irgendeinem Grunde nicht sofort verarbeitet

werden können, so sind sie im Kühlschrank bei +4 °C bis +5 °C aufzubewahren, jedoch nicht länger als zwei Stunden. Bei längerer Lagerung konnte eine Verlängerung der Thromboplastinzeit beobachtet werden.

Mit dieser sogenannten "TROPFENMETHODE" kann eine "Verunreinigung" der Probe mit Gewebsthrombokinase weitestgehend vermieden werden. Da die Kanüle locker in der Vene des Tieres liegt, wird bei etwaigen Abwehrbewegungen gewährleistet, daß die Kanüle nicht durch die Venenwand hindurch in das umliegende Bindegewebe gelangt und dadurch Gewebsthrombokinase in die Kanüle gelangt. Das üblicherweise verwendete starre System "Spritze mit aufgesetzter Kanüle" kann bei plötzlichen Abwehrbewegungen aus der Vene austreten, hochaktive Gewebsthrombokinase würde dann mitaufgesaugt. Wie festgestellt werden konnte, verfälscht dieser nachteilige Effekt die Blutgerinnungszeiten erheblich.

3.1.6 Reinigung der benützten Geräte

Die Teströhrchen wurden nach Beendigung des Häkelvorgangs verworfen, ebenso die Zentrifugenröhrchen. Die Glasröhrchen waren sehr leicht zu reinigen, nachdem sie in lauwarme Prillösung eingelegt worden waren. Die Säuberung der Elektroden im Elektrodenhalter bedurfte der Beachtung folgender Punkte.

Die eingebauten Elektroden wurden durch Abflammen gesäubert. Jedoch durften sie nur einen kurzen Zeitraum von ein bis zwei Sekunden in die Flamme eines Laborbrenners gehalten werden, denn ein Glühen der Elektroden war zu vermeiden, um allzu großen Verschleiß derselben zu verhindern. Es erwies sich als vorteilhaft, auftretende Coagulationsrückstände mit Zellstoff vorsichtig abzuwischen und erst hiernach kurz abzuflammen. Dadurch konnte einer größeren Krustenbildung an den Elektroden entgegenge wirkt werden.

Es durfte auf keinen Fall das Führungsrohr des Elektrodenhalters mit erwärmt werden. Es dient als Massekontakt und kann durch Erwärmung zerstört werden.

Die Elektrodenreinigung wurde nach jedem Häkelvorgang durchgeführt.

3.1.7 Thrombokinasetherstellung

Von Blut und Gewebsresten gesäuberte Eintagskükengehirne wurden mit einem Ultraturrax bei 20.000 Upm homogenisiert. In einem Becherglas wurde das Homogenisat dreimal mit der dreifachen Menge säurefreien Acetons gewaschen. Anschließend - nach Abgießen des Überstandes - wurde die Substanz im Trockenschrank bei 40 °C solange getrocknet, bis kein Acetongeruch mehr feststellbar war. Dem entstehenden Pulver wurden pro Gramm Substanz 25 ml physiologische Kochsalzlösung und 0,5 ml 1,34 %-ige Natriumoxalatlösung zugegeben. Die Aufschwemmung wurde dann 30 Minuten lang in einem 50 °C bis 54 °C heißem Wasserbad gehalten. Danach wurde fünf Minuten lang bei 2000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Glasampullen à 1 ml Inhalt abgefüllt. Die Ampullen wurden mit Hilfe eines Laborbrenners verschmolzen.

Falls das Thromboplastin sofort nach Herstellung Verwendung findet, kann es bei Zimmertemperatur gelagert werden. Bei längerer Aufbewahrungszeit sollte es zweckmäßigerweise bei Kühlschranktemperatur gehalten werden.

3.1.8 Statistische Auswertungsverfahren

Von allen während eines Versuchstages ermittelten Gerinnungszeiten einer Rationsgruppe wurde der arithmetische Mittelwert gebildet, so daß für jeden Versuchstag pro Gruppe ein Tagesmittelwert zur Verfügung stand. Diese Tagesmittelwerte wurden dann zur Ermittlung der Regressionsgeraden verwendet.

Außerdem wurden für die Versuche 3 und 4 die biologischen Aktivitätswerte (Titer) für die verschiedenen Testsubstanzen im Vergleich zu einem Standardpräparat ermittelt (nach Cavalli-Sforza 1969).

3.2 Testsubstanzen

Menadion-Dimethyl-Pyrimidinol-Bisulfit (MPB)

Hetrazeeen; 22,5 % Menadiongehalt

Lieferant: Randstad Branch, Niederlande

Prod. Nr. 16100

Abl. Nr. 59-0726

Menadioldiacetat (BASF)

67,4 % Menadiongehalt

121 III b

Menadioldibutytrat (BASF)

55,0 % Menadiongehalt

121 IV b

Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB)

Olpesa, 49,5 % Menadiongehalt

120 I

Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB) BASF

50,4 % Menadiongehalt

120 II

Menadion-Natrium-Bisulfit (MSB) MEP/D

(BASF) 54 % Menadiongehalt

K9/63

Dohyfral^R K₃ 25

25 % Menadiongehalt

CN: 550042-18-209

(Duphar B.V. Amsterdam, Holland)

Dry stabilized Vitamin K₃ Preparation

Als Depletionshilfe fand folgendes Produkt Anwendung:

Cumatetralyl 99,2 %-ig

(Wirkstoff: Racumin technisch)

Sample PT 33/83

Bayer Leverkusen

4. VERSUCH I

4.1 Versuchsanlage

In Versuch I, der als orientierendes Experiment angelegt war, sollte die Wirkungsweise und die Zuverlässigkeit des Coagulometers geprüft werden. Hierzu wurde das Coagulometer nach Schnitger und Gross sowohl mit Citratplasma- als auch mit Citratvollblutproben beschickt. Weiterhin sollte die Werteentwicklung mit der üblicherweise angewandten Methode verglichen werden, bei der eine Platinöse durch den im 37 °- 38 °C warmen Wasserbad gehaltenen Versuchsansatz bis zur sichtbaren Gerinnung gezogen wird.

Die Versuchsanlage ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Als Cumatetralyl-Dosierung wurden 15 ppm im Futter gewählt. Als Standardsubstanz diente MPB in den Dosierungen 30, 60 und 120 ppb in den Rationen. Orientierend getestet wurden Menadioldiacetat und MSB (BASF) jeweils mit 60 ppb im Futter.

Die Konzentrationsangaben der verschiedenen Vitamin K-Produkte beziehen sich hier wie auch in den folgenden Versuchen auf die Menadion-äquivalenz, das heißt auf die tatsächlich eingebrachte Menadion Menge des jeweiligen Produktes.

Tabelle 2: Versuchsanlage zu Versuch I
Tierzahl 5 x 3 x 12 Broiler
(B 975, männl.) 21 Tage Vor-
periode (1 mg CT/kg Futter)
Versuchsdauer 16 Tage

Code	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Menadionäquivalent (ppb) aus					
MPB	30	60	120	-	-
MSB	-	-	-	60	-
Menadioldiacetat	-	-	-	-	60
ppm CT	15	15	15	15	15
Tierzahl	3x12	3x12	3x12	3x12	3x12

4.2 Versuchsdurchführung

Zu Beginn der Vorperiode wurden 253 Eintagsküken in Gruppen zu 10 und 11 Tieren auf 24 Käfige verteilt. In 21 Tagen Vorperiode wurden den Tieren die Vitamin K arme Basalration mit 1ppm CT im Futter verabreicht.

Am Anfang der Versuchsperiode hatten die Tiere ein mittleres Lebendgewicht von 429 g. Sie wurden gewichtsgleich auf 15 Käfige zu je 12 Tieren aufgeteilt. Nach der Wiegung wurde mit der Fütterung der Rationen begonnen. Über die Blutentnahmezeitpunkte und Art und Umfang der Proben gibt Tabelle 3 Aufschluß.

Tabelle 3: Blutentnahme und Probenumfang
pro Gruppe und Tag
(Fütterung der Testrationen =
1. Versuchstag)

Versuchstag	Citratplasma übliche Methode	Citratplasma Coagulometer	Citratvollblut Coagulometer
1. - 3.	-	-	-
4.	4	-	-
5.	-	4	-
6. - 7.	4	4	-
8.	-	-	-
9.	-	10	10
11. - 14.	4	4	4
15.	-	-	-
16.	-	10	10

4.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuch I sind in den Tabellen
4 und 5 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Zusammengefaßte Versuchsergebnisse

Code	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Menadionäquiva- lent (ppb) aus					
MPB	30	60	120	-	-
MSB	-	-	-	60	-
Menadioldiacetat	-	-	-	-	60
ppm CT	15	15	15	15	15
Mortalität %	47,2	30,6	16,7	36,1	41,7
Thrombo- plastinzeit ¹⁾ (sec)	184,0	152,8	123,9	146,5	157,2

1) Gesamtmittelwert aus 8 Testtagen (= 8 Tagesmittel-
werte), ermittelt mit dem Coagulometer anhand
von Citratplasma Proben.

Tabelle 5: Vergleich der Thromboplastinzeiten (sec)

Coagulometer Citratplasma (CP)

Coagulometer Citratvollblut (CVB)

Code	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Menadionäquiva- lent (ppb) aus					
MPB	30	60	120	-	-
MSB	-	-	-	60	-
Menadioldiacetat	-	-	-	-	60
ppm CT	15	15	15	15	15
9. Testtag CP	226,9	194,0	116,1	165,5	134,1
CVB	270,6	207,6	144,5	178,8	186,1
11. Testtag CP	141,5	111,2	112,7	119,6	155,7
CVB	153,2	125,5	126,2	158,6	173,5
12. Testtag CP	133,0	96,5	117,3	139,1	117,4
CVB	150,3	98,2	141,4	152,2	142,8
13. Testtag CP	227,6	191,4	141,4	114,4	137,9
CVB	248,0	186,8	150,5	141,8	156,3
14. Testtag CP	142,1	135,5	141,6	167,0	220,2
CVB	151,3	140,7	149,3	177,5	188,3
16. Testtag CP	311,5	266,4	155,8	194,8	138,7
CVB	218,0	299,8	154,0	214,1	244,5

4.3.1 Mortalität

Mit steigender Vitamin K Konzentration im Futter fiel die Mortalitätsrate ab (30,60 bzw. 120 ppm Menadion als MPB). Bei beiden Testrationen (4) und (5) war die Mortalität beim Menadioldiacetat höher als beim MSB. Trotzdem lagen die Prüf-rationen geringfügig höher als die entsprechende Ration (2) des Standards. Würden hieran Unterscheidungen hinsichtlich der Güte der verwendeten Präparationen angestellt, so hätten die Prüfsubstanzen eine geringere Wirksamkeit als MPB. Der Parameter Mortalität ist allerdings insoweit durch versuchstechnische Einflüsse verfälscht, als durch die Manipulation Blutentnahme einige Tiere starben und in die Gesamtzahl verendeter Tiere mit einbezogen wurden.

4.3.2 Thromboplastinzeit

Beim Vergleich der erzielten Blutgerinnungszeiten eines Individuums zwischen üblicher Methode, Coagulometer mit Citratplasmaansatz und Coagulometer mit Citratvollblutansatz traten einige bemerkenswerte Unterschiede auf.

Bei der üblichen Methode konnte an einigen Blutentnahmetagen keine Gerinnung im Versuchsansatz erzielt werden. Dies hatte zur Folge, daß für verschiedene Testtage kein Tagesmittelwert zur Verfügung stand und demnach auch kein Gesamtmittel aus allen Blutentnahmetagen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß im Wasserbad keine optimalen Bedingungen für den Versuchsansatz herrschten. Es mögen trotz bestmöglicher Umwälzung des Wassers Temperaturunterschiede auftreten, die dann zu einer verlangsamten Erwärmung der Probe führten oder zeitweise sogar zu einer kurzdauernden Überhitzung Anlaß gaben, was natürlicherweise negative Einflüsse auf die im Versuchsansatz befindlichen Gerinnungsfaktoren

hat. Diese Nachteile hat das Coagulometer nach Schnitger und Gross nicht (gleiche Temperaturverhältnisse durch Thermostatkontrolle).

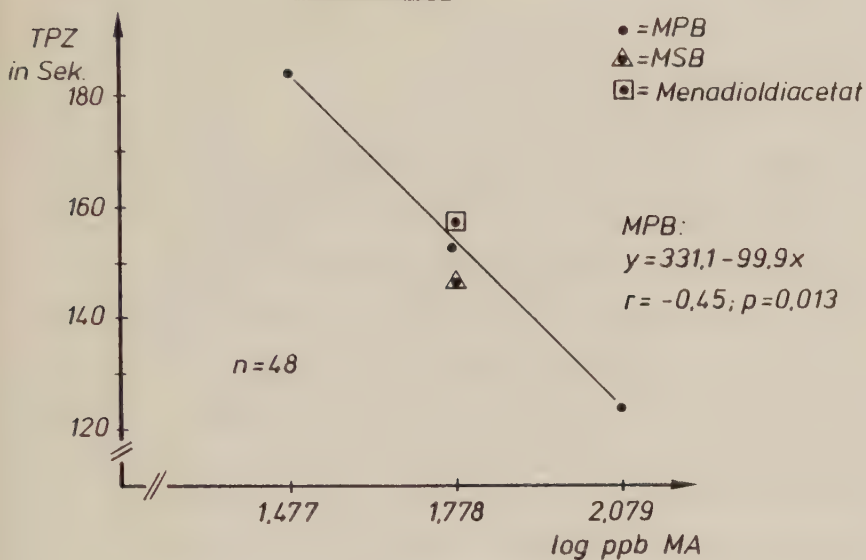
Trotzdem konnten beim Vergleich von Plasma- und Vollblutproben Unterschiede gesehen werden (Tabelle 5). Zum einen wird deutlich, daß bei den Vollblutproben in der Regel verlängerte Gerinnungszeiten gegenüber den Plasmaproben auftraten. Dies mag auf die spezielle Blutzusammensetzung beim Huhn zurückzuführen sein. Es könnten die noch vorhandenen korpuskulären Bestandteile eine Behinderung der Mechanik (Häkchenprinzip) des Gerätes bedeuten.

Außerdem wurde bei der Ermittlung der Regressionsgeraden beobachtet (Abbildung 3), daß die Werte für die einzelnen Rationen des Standards nicht so exakt auf der Geraden lagen, als dies bei den Citratplasma-proben der Fall war.

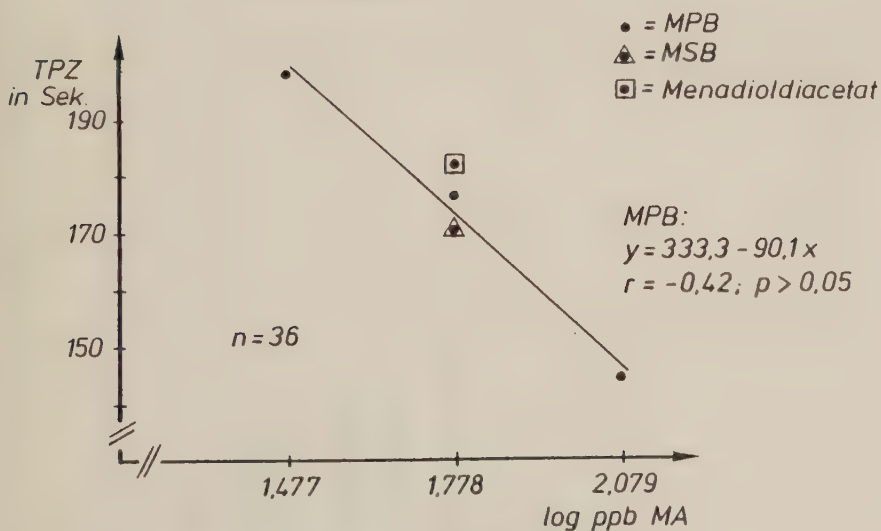
Alle diese Überlegungen führten dazu, in allen weiteren Versuchen die Thromboplastinzeit mit dem Coagulometer anhand von Citratplasma-proben zu bestimmen.

Abb.4.: Vergleichende Darstellung der Regressionsgeraden des Standards (MPB) - (Citratplasma, Citratvollblut)

Citratplasma



Citratvollblut



x-Achse = log ppb Menadionäquivalent (MA)

y-Achse = Thromboplastinzeit (TPZ) in Sekunden

5. VERSUCH II

5.1 Versuchsanlage

Im Versuch II wurden verschiedene Vitamin-K Produkte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit überprüft. Hierfür wurden pro Prüfpräparation drei Dosierungen gewählt (30, 60, 120 mcg Menadion-äquivalent/kg Futter). Neben der Gerinnungszeit wurden Gewichtszunahme, Futterverzehr und Futterverwertung sowie die Mortalität als Versuchsparameter herangezogen. Anhand dieser Werte sollten auftretende Unterschiede in der Blutgerinnungszeit untermauert werden.

Tabelle 6 zeigt die Versuchsanlage von Versuch II.

5.2 Versuchsdurchführung

Zu Beginn der Vorperiode wurden 264 Eintagsküken (männl. Lohmann B 975) zu je 12 Tieren auf 22 Käfige verteilt. Nach 21 Tagen erfolgte die erste Wiegung und das gewichtsgleiche Einteilen der Küken (je 7 Tiere auf 24 Käfige). Die mittlere Lebendmasse am Anfang der Versuchsperiode belief sich auf 503 g (± 1). Unmittelbar nach Einteilung wurde das Versuchsfutter zugeteilt (= 1. Tag der Versuchsperiode abends). Die 12 Rationen wurden nach Zufall auf die 24 Käfige verteilt.

Die Blutentnahmetage verteilten sich wie folgt: der 1. bis 3. Blutentnahmetag entsprach den Tagen 6 bis 8 der Versuchsperiode; der 4. Blutentnahmetag wurde auf den 10. Tag des laufenden Versuchs gelegt; die Entnahmetage 5 bis 7 wurden an den Tagen 12, 13 und 14 der Versuchsperiode durchgeführt. Am Morgen des 15. Versuchstages wurden abschließend alle Küken einzeln gewogen. Pro Blutentnahmetag wurden pro Rationsgruppe 5 Blutproben entnommen.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Vorperiode

In der Vorperiode lag die Mortalitätsrate bei 8,7 %. Die Zunahmen pro Tier betrugen 460 g, bei einem Futterverzehr von 41 g pro Tier und Tag. Daraus resultiert eine durchschnittliche Futterverwertung (in g Futter/g Zunahme) von 1,88.

5.3.2 Versuchsperiode

Die Ergebnisse der Versuchsperiode sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: Übersicht der kumulativen Ergebnisse von Versuch II

Tierzahl: 12 x 2 x 7 Broiler; Sensibilisierung mit 15 ppm CT im Futter

Versuchsdauer: 15 Tage

Code	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
ppb Menadion												
aus MPB	30	60	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aus Menadiol- diacetat	-	-	-	30	60	120	-	-	-	-	-	-
aus MSB ^R (Dofyral ^R)	-	-	-	-	-	-	30	60	120	-	-	-
aus Menadiol- dibutyrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	60	120
Mortalität %												
Zunahme (g/Tier)	28,6	35,7	14,3	42,9	21,4	7,1	28,6	7,1	7,1	50,0	35,7	7,1
Futtermittelverzehr/ Tier und Tag in g	377	341	525	370	320	381	233	350	416	326	457	423
g Futter/g Zunahme	3,27	3,32	2,33	3,20	3,39	2,95	3,60	3,14	3,05	3,53	2,85	2,87
Thromboplastinzeit in sec.	234,8	203,0	175,1	258,6	204,3	190,6	223,1	192,4	157,7	261,0	213,6	193,9

5.3.2.1 Mortalität

Analog zu Versuch I läßt sich auch hier nur tendenzmäßig ein Zusammenhang zwischen Dosierung und Güte des Vitamin K Produktes sowie der Mortalitätsrate herstellen. Werden nur diese Werte für den Vergleich herangezogen, so wird deutlich, daß sich MPB (Hetrazeen) und MSB (Dohyfral^R) auf gleicher Ebene bewegen (28,6 %), gefolgt von Menadioldiacetat und Menadioldibutyrat (42,9 % und 50,0 %). Jedoch schon in den Rationen mit 60 mcg Menadionäquivalent/kg Futter können diese oben genannten Rückschlüsse nicht mehr bestätigt werden. Deshalb sollte der Parameter Mortalität nicht überbewertet werden und immer unter den Gesichtspunkten, die in Versuch I geschildert wurden, betrachtet werden.

5.3.2.2 Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung

Anhand dieser Parameter sind keine zwingenden Rückschlüsse auf Unterschiede in der Güte der Vitamin K Präparationen zu ziehen. Bei den Rationen mit 30, 60 und 120 ppb Menadionäquivalent aus MSB (Dohyfral^R) im Futter kann zumindest eine ansteigenden Wertefolge innerhalb der Dosierungen gesehen werden.

Alle diese wenig aussagenden Versuchspärparameter sind wohl auf versuchstechnisch begründete Ursachen zurückzuführen. Es wurde beobachtet, daß Küken den Versuch mit relativ wenig Futteraufnahme überstehen. Gewichtsabnahme und schlechte Futterverwertung sind die Folge, obwohl mehrere Tiere dieser Gruppe "gute" Werte zeigen.

Diese Überlegungen führten dazu, auf die Parameter Gewichtsentwicklung, Futterverzehr und Futterverwertung in den folgenden Versuchen zu verzichten.

5.3.2.3 Thromboplastinzeit

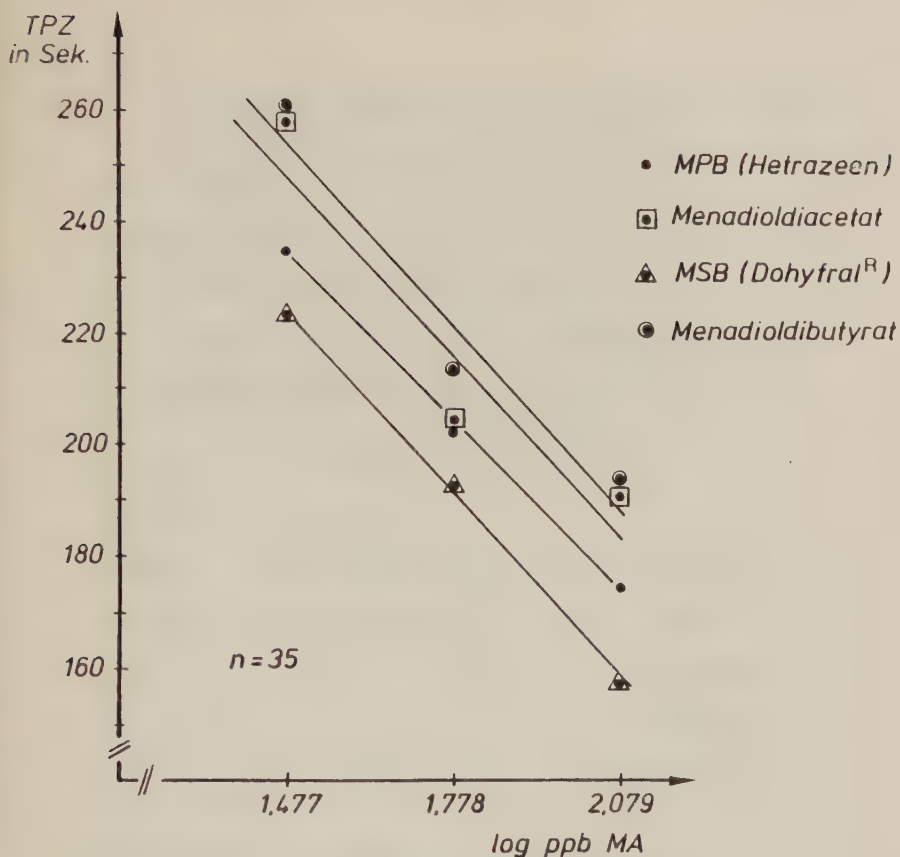
Die Darstellung der Regressionsgeraden aus Versuch II stellt Abbildung 5 dar.

Anhand der Regressionsgeraden ist eine gute Übereinstimmung mit Versuch I zu erkennen. Menadioldiacetat liegt mit den ermittelten Werten über denen von MPB (Hetraceen). Menadioldibutyrat weist noch höhere Blutgerinnungszeiten auf, und somit liegt die Regressionsgerade höher als die vom Menadioldiacetat. MSB (Dohyfral^R) zeigt die niedrigsten Blutgerinnungswerte von allen vier Vitamin K Produkten. MSB (Dohyfral^R) sollte aufgrund seiner guten Eigenschaften (auch hinsichtlich der Auswertung) als Standardsubstanz für alle weiteren Versuche herangezogen werden.

Werden Gütebewertungen mittels der erhaltenen Geraden angestellt, so zeigt sich MSB (Dohyfral^R) als bestes Präparat, welches in der Lage ist, die Blutgerinnungszeiten unter Streßbedingungen (= 15 ppm CT

im Futter) am niedrigsten zu halten. Danach folgen (bei den gleichen Streßbedingungen) MPB (Hetrazeen), weiter Menadioldiacetat und schließlich Menadioldibutyrat. Nimmt man die biologische Aktivität von MSB (Dohyfral^R) mit 100 % an, so ergibt sich aufgrund der höheren Blutgerinnungszeiten folgende prozentuale Wirksamkeit der drei anderen Vitamin K Präparationen gegenüber MSB (Dohyfral^R), die in Tabelle 8 angegeben ist.

Abb. 5: Regressionsgeraden aus Versuch II



MPB:

$$y = 380,5 - 99,1x$$

$$r = -0,6666; p = 0,00005$$

MSB:

$$y = 384,2 - 108,6x$$

$$r = 0,7069; p = 0,0000$$

Menadioldiacetat

$$y = 418,5 - 112,9x$$

$$r = -0,6082; p = 0,0015$$

Menadioldibutyrat

$$y = 420,9 - 111,4x$$

$$r = -0,5659; p = 0,0035$$

Tabelle 8: Schätzung der prozentualen Wirksamkeit
von MPB (Hetrazeen), Menadioldiacetat
und Menadioldibutyrat gegenüber MSB
(Dohyfral^R) (ermittelt aus dem Verhältnis
der Mittelwerte der drei Vitamin-K
Konzentrationen 30, 60 und 120 mcg
Menadionäquivalent/kg Futter anhand der
Gerinnungszeitdifferenzen)

Vitamin-K Präparation	Wirksamkeit in %
MSB (Dohyfral ^R)	100,0
MPB (Hetrazeen)	92,8
Menadioldiacetat	85,7
Menadioldibutyrat	83,0

Es handelt sich bei dieser Wertbemessung um eine sehr vereinfachte Darstellung. Trotzdem können hier bereits Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit der Vitamin K Präparationen erkannt bzw. vermutet werden.

6. VERSUCH III

6.1 Versuchsanlage

In Versuch III wurden MSB (Dohyfral^R), Menadioldiacetat, Menadioldibutytrat, MSB-MEP/D (BASF) und MSB (Olpesa) miteinander verglichen. Hierbei sollte erstmals statistisch überprüft werden, ob Abweichungen von der Linearität und Parallelität zwischen den Regressionsgeraden der verschiedenen Vitamin K Produkte auftreten und somit eine Wertbemessung überhaupt zulässig ist oder nicht. Als Standard wurde dabei jeweils MSB (Dohyfral^R) verwendet. Bei den Rationen mit Menadioldiacetat und Menadioldibutytrat wurde jeweils die 1,15-fache Menge Menadioläquivalent ins Endfutter eingebracht. Diese Maßnahme sollte zeigen, inwieweit sich dadurch die Blutgerinnungszeiten dieser Substanzen denen des Standards nähern.

Ein zweiter Hauptpunkt in Versuch III war die Prüfung verschiedener Vitamin K Produkte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit nach "Belastung". Für diese Untersuchung wurden Menadioldiacetat, Menadioldibutytrat

MSB-MEP/D (BASF) und MSB (Olpesa) herangezogen. Die "Belastung" bestand darin, einen 0,1 %-igen Prämix längerer Zeit bei gesättigter Wasserdampfumgebung und 37 °C hoher Temperatur zu inkubieren. Über die Zusammensetzung des Prämix gibt Tabelle 9 Auskunft.

Auch hier wurde beim Menadioldiacetat und Menadioldibutyrat die 1,15-fache Menge Menadionäquivalent ins Futter eingemischt.

Aufbewahrt wurden die vier Vormischungen (0,1 %ig) in einem Trockenschrank, welcher konstant auf 37 °C eingestellt war. Zur Erlangung der gesättigten Wasserdampfumgebung wurden mit Wasser gefüllte Schälchen in den Trockenschrank gestellt, die einmal pro Tag mit Frischwasser beschickt wurden. Insgesamt wurden die Vormischungen 6 Tage und 16 Stunden in diesem Milieu untergebracht. Etwa in der Hälfte dieser Belastungsperiode wurde die vorliegende Prämixmenge gut durchgemischt, so daß gewährleistet war, daß kein Totraum innerhalb der Mischung entsteht und dort das Vitamin-Produkt dem

Tabelle 9: Zusammensetzung des inkubierbaren
Prämix für die Belastungsstudie

Prozent in der Mischung	Komponenten	Gewichtsanteil in g
20,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100,0
10,0	Spurenelement-VM ¹⁾	50,0
0,1	Vitamin-K Produkt (Menadionäquivalent)	0,5
<u>69,9</u>	Sojafeinmehl	<u>349,5</u>
100,0		500,0

1) die Zusammensetzung der Spurenelementvormischung
ist in Tabelle 1 unter 3.1.2. Fütterung nachzu-
lesen.

Einfluß des Milieus mehr oder weniger ausgesetzt war.

Anhand dieser Hitzebelastung sollte geprüft werden, ob unter den getesteten Präparationen stabile Substanzen sind, die die heute üblichen Futterherstellungsverfahren (z.B. Pelletieren) unbeschadet oder wenigstens mit wenigen Aktivitätsverlusten überstehen können.

Die Versuchsanlage und Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

6.2 Versuchsdurchführung

Zu Beginn der Vorperiode wurden 1400 männliche Eintagsküken (Lohmann B 975) auf 104 Käfige verteilt. Am Ende dieser Periode (21 Tage) betrug die durchschnittliche Lebendmasse eines Kükens 514 g. Nach gewichtsgleicher Einteilung wurden 1200 Küken in Gruppen zu zwölf Tieren auf 100 Käfige verteilt. Die Rationsverteilung im Raum erfolgte nach Zufall. Der erste Tag der Versuchsperiode entsprach dem

Tabelle 10: Versuchsanlage und Ergebnisse zu Versuch III

Tierzahl: 20 x 5 x 12 Broiler: Sensibilisierung mit 15 ppm CT im Futter

Code	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
ppb Menadion																				
aus MSB (Dohyfral ^R)	30	60	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
aus Menadiol- diacetat	-	-	-	30	60	120	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-	-	-	-	-
aus Menadiol- dibutytrat	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-	-	-
aus MSB-MEP/D (BASF)	-	-	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-
aus MSB (Olpesa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	90	-	-	-	-	-	-	45	90
Faktor f ¹⁾				1,15	1,15	1,15	1,15	1,15	-	-	-	-	1,15	1,15	1,15	1,15	-	-	-	-
0,1 %-iger Prämix	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht	nicht
Mortalität %	43,3	21,7	18,3	46,7	28,3	26,7	26,7	20,0	40,0	28,3	35,0	25,0	43,3	40,0	35,0	21,7	58,3	51,7	48,3	43,3
Trugbrütlas- tinzeit (Sek.)	154,8	124,1	103,0	158,4	137,0	122,0	154,5	134,9	143,7	122,9	152,1	134,3	146,8	123,9	153,1	131,3	181,4	153,4	189,9	176,2

1) 1,15-fache Menne Menadionäquivalent ins Futter eingebracht

ersten Tag der Versuchsfütterung. Die Reihenfolge der Blutentnahmetage fiel auf die Tage 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13 und 15 des laufenden Versuchs. Es standen also 8 Testtage (=Blutentnahmetage) der Auswertung zur Verfügung. An jedem Entnahmetag wurden pro Ration 5 Küken untersucht (= 1 Tier/Käfig und Tag). Demnach setzte sich ein Tagesmittelwert aus 5 Einzelwerten zusammen.

6.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuch III sind in Tabelle 10 aufgelistet.

6.3.1 Mortalität

Die Zahlen der Mortalität sind immer unter den in Versuch I und II genannten Aspekten zu sehen. Werden die erzielten Werte miteinander verglichen, so sind auch in Versuch III Zusammenhänge hinsichtlich der biologischen Aktivität der Vitamin K Präparationen nicht zu erkennen. Es scheint auch keine andere Beziehung zwischen Mortalität und Dosierung der

jeweiligen Vitamin K Substanz einerseits und der Thromboplastinzeit andererseits zu bestehen.

6.3.2 Thromboplastinzeit

Die Darstellung der Regressionsgeraden ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Im Versuch II wurde eine statistische Überprüfung der Regressionsgeraden durchgeführt. In allen Vergleichen gegen MSB (Dohyfral^R) war eine Wertbemessung zulässig, da keine signifikanten Abweichungen von der Linearität und Parallelität der Wirkungsgeraden auftraten. Ermittelt wurde der Titer der Prüfpräparate Menadioldiacetat, Menadioldibutyrat, MSB-MEP/D (BASF) und MSB (Olpesa). Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Da hier eine Wertbemessung zulässig ist, kann eine Gütereihenfolge der unbelasteten Präparate angestellt werden. Demnach muß gemessen am MSB (Dohyfral^R) das MSB-MEP/D (BASF) als wirksamste Vitamin K Präparation angesehen werden (Titer 80%). Die anderen Vitamin K Präparationen verhalten sich in etwa gleich. Ihre Titer liegen zwischen 50 und 60 %. Eine Angleichung

Tabelle 11: Titer der Prüfpräparate und Relative
Titer nach Belastung
(Prüfsubstanz bezogen auf MSB Dohyfral^R)
(Anmerkung: Die Auflistung der einzelnen
Varianztabellen zu Versuch III finden
sich im Tabellenanhang)

Titer der Prüfpräparate

<u>Prüfsubstanz</u>	<u>Biologische Menadion- äquivalenz</u>
Menadioldiacetat	60 %
Menadioldiacetat, belastet	66 %
Menadioldibutyrat	50 %
Menadioldibutyrat, belastet	54 %
MEP/D	88 %
MEP/D, belastet	33 %
MSB Olpesa	60 %
MSB Olpesa, belastet	21 %

Relative Titer nach Belastung

Menadioldiacetat	108 (kein Verlust)
Menadioldibutyrat	109 (kein Verlust)
MEP/D	38 (62 % Verlust)
MSB Olpesa	26 (74 % Verlust)

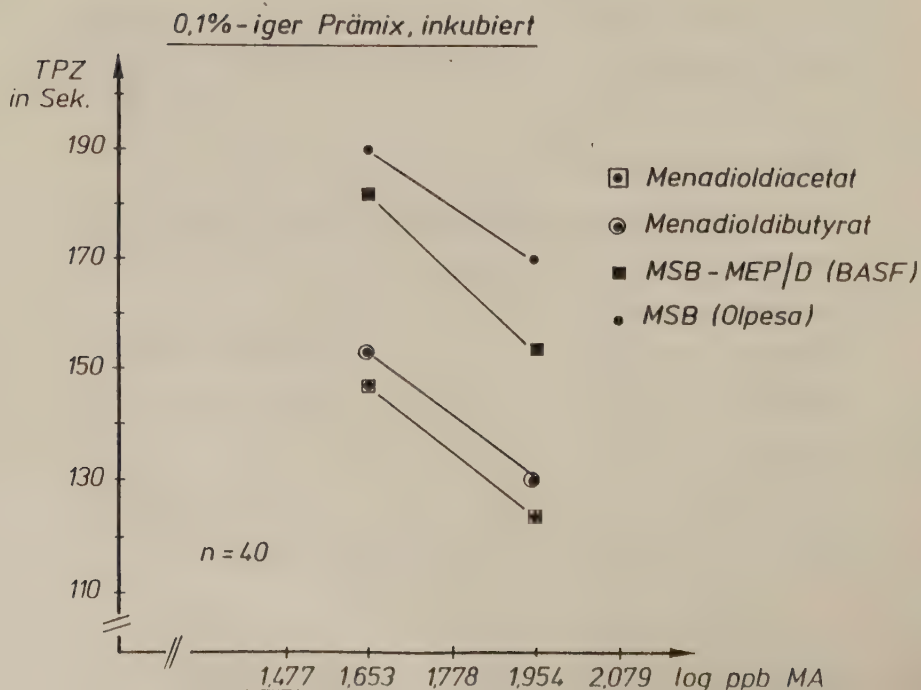
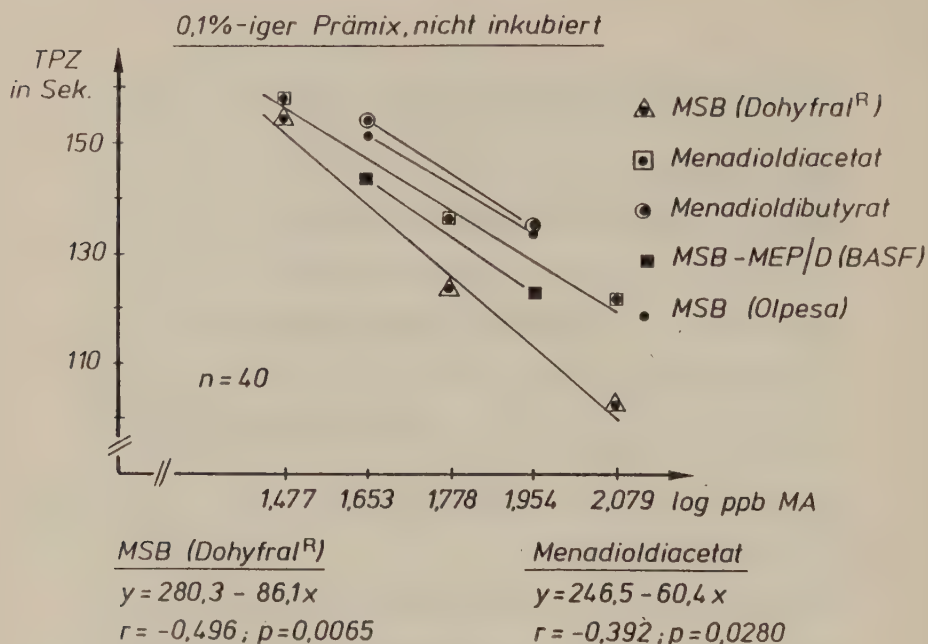
der Blutgerinnungszeiten von Menadioldiacetat und Menadioldibutyrat an den Standard durch eine 1,15-fache Äquivalenteinmischung ins Futter wie annäherungsweise aus Versuch II geschätzt, wurde nicht erreicht.

Interessant war in Versuch III das Ergebnis der Belastungsproben. An den relativen Titern nach Belastung (Tabelle 11) ist abzulesen, daß die beiden Menadiolverbindungen keinen Wirkverlust aufweisen. Eher kann noch ein geringer Wirkungszuwachs verzeichnet werden.

Die beiden MSB Verbindungen zeigten hingegen starke Aktivitätsverluste (MSB-MEP/D (BASF): 62 % Verlust; MSB (Olpesa): 74 % Verlust). Es ist daher anzunehmen, daß beide Verbindungen unzureichend oder gar nicht stabilisiert sind. Bei den Menadiolverbindungen scheint eine Hitzebelastung die Verfügbarkeit nicht zu stören.

In Versuch III konnten als herausragendes Ergebnis zwei Vitamin K Präparationen (Menadioldiacetat, Menadioldibutyrat) als wohl absolut stabile Verbindungen aufgezeigt werden.

Abb.6: Regressionsgeraden aus Versuch III



7. VERSUCH IV

7.1 Versuchsanlage

In Versuch IV sollte der Einfluß des Depletions-
hilfsmittels Cumatetralyl (CT) auf die Versuchs-
auswertung mit untersucht werden. Hierzu wurden
Futterrationen mit 10 ppm CT (10 mg/kg Futter)
und 15 ppm CT (15 mg/kg Futter) hergestellt. Ge-
testet wurden Menadioldiacetat, Menadioldibutyrat,
MSB-MEP/D (BASF). Als Standard kam wieder MSB
(Dohyfral^R) zur Verwendung. Die Standardsubstanz
wurde in drei Dosierungen (30, 60, 120 ppb Menadion)
dem Futter zugesetzt, während die drei Testsubstanzen
in nur zwei Dosierungen zum Einsatz kamen. Die Versuchs-
anlage und die Ergebnisse sind aus Tabelle 12 zu entnehmen.

7.2 Versuchsdurchführung

900 männliche Eintagsküken (B 975 Lohmann) wurden
in einer 3-wöchigen Vorperiode mit der Vitamin K
armen Diät mit 1 ppm CT gefüttert. Zu Beginn der
Versuchsperiode wurden 720 Tiere gewichtsgleich

auf 72 Käfige (10 Tiere/Käfig) verteilt. Die durchschnittliche Lebendmasse bei Versuchsbeginn betrug 516 g. Der Versuch dauerte insgesamt 15 Tage. Die Blutentnahme erfolgte an den Tagen 7, 8, 10, 11, 12, 13 und 15 der Versuchsperiode. An jedem Blutentnahmetag wurden 4 Blutproben pro Gruppe (=1 Tier/Käfig) entnommen. Zur Ermittlung des Tagesmittelwertes für die Blutgerinnungszeitmessung standen somit pro Gruppe 4 Einzelwerte (bei 7 Testtagen) zur Verfügung.

7.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuch IV sind in Tabelle 12 dargelegt.

7.3.1 Mortalität

Hinsichtlich der Mortalitätsrate konnten 10 ppm CT gegenüber 15 ppm CT im Futter keine Verbesserung der Aussagefähigkeit der in den vorangegangenen drei Versuchen erzielten Ergebnisse bewirken. Auch in Versuch IV sind die Mortalitätsraten kein präziser Parameter für die Bewertung der getesteten Vitamin K Präparate. Allerdings waren die Verluste bei 10 ppm CT deutlich geringer als bei 15 ppm CT im Futter.

Tabelle 12: Versuchsanlage und Ergebnisse zu Versuch IV
Tierzahl 18 x 4 x 10: 72 Käfige à 10 Tiere

Code	(1)	(2)	(3)	(7)	(8)	(11)	(12)	(15)	(16)	(4)	(5)	(6)	(9)	(10)	(13)	(14)	(17)	(18)
fpb Menadion																		
aus MSB (Dohyfral ^R)	30	60	120	-	-	-	-	-	-	30	60	120	-	-	-	-	-	-
aus Menadiol- diacetat	-	-	-	90	180	-	-	-	-	-	-	-	90	180	-	-	-	-
aus Menadiol dibutyrat	-	-	-	-	-	100	200	-	-	-	-	-	-	-	100	200	-	-
aus MSB-MEP/D (BASF)	-	-	-	-	-	-	-	66	132	-	-	-	-	-	-	-	66	132
pom CT	jeweils	10								jeweils	15							
Mortalität %	28,2	20,0	5,4	43,3	30,9	20,1	13,4	18,6	30,0	38,0	50,1	30,2	30,2	30,2	30,8	35,7	28,9	45,3
Thromboplas- tinzeit (Sek)	123,0	99,5	81,3	98,3	82,5	96,2	75,0	100,7	78,3	148,8	126,7	104,4	125,1	104,5	122,0	102,6	130,0	108,3

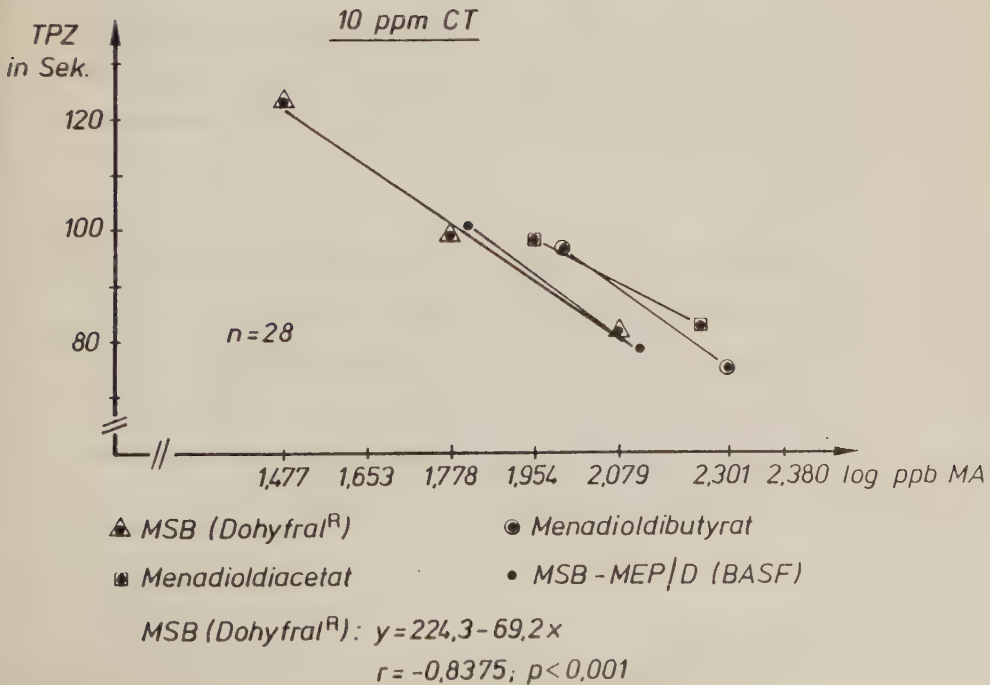
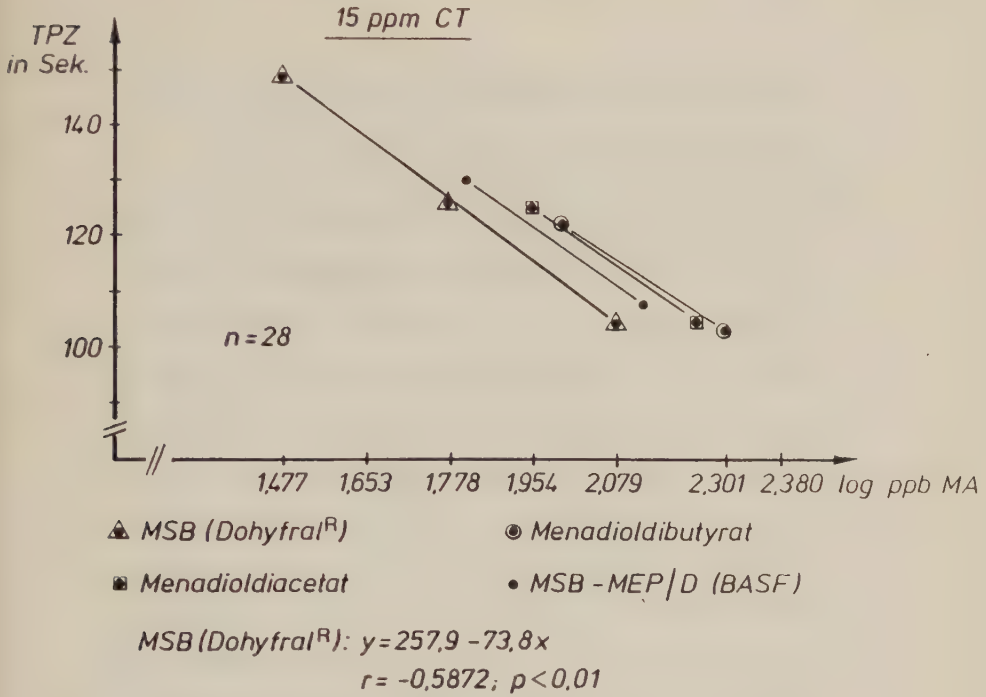
7.3.2 Thromboplastinzeit

Die Regressionsgeraden aus Versuch IV sind in Abbildung 7 aufgezeichnet.

Auch in Versuch IV wurde geprüft, ob eine Wertbemessung zwischen den einzelnen Vitamin K Präparationen zulässig ist. Es gab auch hier keine signifikanten Abweichungen von Linearität und Parallelität der Wirkungsgeraden. Die Titer der Prüfsubstanzen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

In Versuch IV konnte ein Vergleich der Wirkungsgeraden bei 10 bzw. 15 ppm CT im Futter aufgestellt werden. Die Regressionsgeraden zeigen wiederum eine für die Versuchsauswertung günstige Steigung. Diese ist bei der niedrigeren Dosierung des Depletionshilfsmittels geringer. Andererseits ist eindeutig zu erkennen, daß der Korrelationskoeffizient bei 10 ppm CT im Futter - absolut gesehen - weitaus höher ist. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Blutgerinnungswerte bei höherer Konzentration des Depletionshilfsmittels weitaus mehr streuen, was auch ein direkter Vergleich der Einzelwerte

Abb.7: Darstellung der Regressionsgeraden aus Versuch IV



zeigte. Weiterhin konnten Verschiebungen in den Wertbemessungsuntersuchungen gesehen werden. Bei MSB-MEP/D (BASF) und bei Menadioldibutyrat steigen die Titer bei geringerer CT Konzentration im Futter mehr oder weniger deutlich an. Dies konnte jedoch bei Menadioldiacetat nicht beobachtet werden (gleicher Titer). In den Rationen mit 15 ppm CT wurde - wie in den anderen Versuchen auch - Menadioldibutyrat stets schlechter bewertet als Menadioldiacetat. Es ist allerdings zu beachten, daß Menadioldibutyrat in einer höheren Konzentration (100 bzw. 200 ppb Menadion) ins Futter eingemischt war. Diese Tatsache könnte auch das Annähern der Regressionsgerade von MSB-MEP/D (BASF) an den Standard bei den Rationen mit 10 ppm CT erklären. Aus allem Gesagten muß jedoch ein - allerdings geringer - Einfluß der Konzentration des Depletionshilfsmittels auf den Versuch angenommen werden.

Insgesamt gesehen liegen die Titer der Prüfsubstanzen in Versuch IV geringfügig höher als in Versuch III. Höhere Abweichungen zeigt nur Menadioldibutyrat. In Versuch III wurde ein Titer von 50 % ermittelt. Ein um 17 % höherer Titer in Versuch IV ist wohl auf eine höhere Konzentration im Futter zurückzuführen.

Tabelle 13: Titer der Prüfsubstanzen bezogen auf
MSB (Dohyfral^R) (bei 10 und 15 ppm CT
im Futter) (Anmerkung: Die Varianz-
tabellen sind im Tabellenanhang für
Versuch IV aufgeführt)

CT (ppm)	10	15
Menadiol- diacetat	69	69
Menadiol- dibutyrat	71	67
MEP/D (MSB)	95	81

8. DISKUSSION

Das in dieser Arbeit verwendete System greift auf Elemente zurück, die schon in einer früheren Untersuchung (Schulz et al 1975) aufgestellt wurden. Neue Techniken der Blutentnahme und der Einsatz eines Coagulometers konnten die Aussagefähigkeit der Versuche verbessern. In allen vier Versuchen konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden (hinsichtlich des empfindlichsten Versuchsparameters Thromboplastinzeit). Eine versuchte Auswertung der Ergebnisse über Mortalität, Lebendmassezunahme, Futterverzehr und Futterverwertung konnte nicht überzeugen. Dies liegt sicherlich auch daran, daß mit der fortdauernden Manipulation während der Blutentnahme Aufregungen in den betreffenden Käfigen und damit im ganzen Stall einhergehen. Doch dies dürfte nicht der Hauptgrund sein. Da das mehlartige Futter nicht in pelletierter Form verabreicht werden kann (dies würde unter Umständen, bereits eine Veränderung des eingemischten Vitamin K Präparates bedeuten), muß davon ausgegangen werden, daß hohe Futterverluste eine verfälschende Wirkung auf die Parameter Futterverzehr

und Futterverwertung haben. Zum anderen gelangen oftmals auch Tiere in die Auswertung, die lange Zeit wenig oder gar kein Futter zu sich genommen haben und damit den Käfigdurchschnitt erheblich verfälschen können.

Ein weiterer Punkt ist die hohe Verlustrate an Küken. Je mehr Tiere in einem Käfig verenden, umso ungenauer wird die Auswertung oben genannter Kriterien. Jedoch sind viele der gestorbenen Küken nicht der Fütterung zuzuschreiben, sondern zum Großteil den an ihnen vorgenommenen Manipulationen. Hier mag die neue Blutentnahmetechnik "Tropfenmethode" einen Nachteil zeigen. Die Tiere werden relativ fest durch den Helfer fixiert, sodaß oftmals kleinste innere Verletzungen in Anwesenheit der doch relativ hohen Cumatetralyl Dosierungen zu Todesfällen führen. Auch ist durch eine hohe Probenanzahl pro Blutentnahmetag eine sicher durchgeführte Blutstillung nicht immer möglich. Aus diesen erörterten Gründen kann die Aussagekraft der Mortalitätsrate - wie bei den einzelnen Versuchen erwähnt - nur der Tendenz nach beurteilt werden.

Das Hauptversuchskriterium Thromboplastinzeit erbrachte reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse. Bei allen vier Versuchen konnten Regressionsgeraden auf halblogarithmischer Basis ermittelt werden, die im Bereich von 30, 60 und 120 ppb Menadiondosierung im Futter eine für die Auswertung günstige Steigung aufwiesen. In allen Versuchen waren die MSB Produkte den Menadiolverbindungen hinsichtlich der Blutgerinnungszeit überlegen. Ausnahme davon ist das MSB (Olpesa), das mit einem in Versuch III ermittelten Titer von 60 % etwa auf der Ebene der Menadiolverbindungen lag. Ob diese Tatsache auf eine verminderte intestinale Verfügbarkeit zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Versuche nicht geklärt werden. MSB (Dohyfral^R) als Standardsubstanz in den Versuchen II bis IV konnte als das wirksamste Vitamin K Produkt angesehen werden. MPB (Hetrazeen) lag in den Versuchen I und II ebenfalls schlechter als die verwendeten MSB-Verbindungen, aber günstiger als die beteiligten Menadiolverbindungen.

Offensichtlich kann aber allen verwendeten Präparationen Vitamin K Wirksamkeit zugesprochen werden.

Das Menadion aus MSB ist aber doch besser verwertbar (beim Kücken) als Menadion aus MPB und den Menadiolverbindungen. Ob hier ein Zusammenhang zwischen intestinaler Verfügbarkeit und chemischer Struktur der Vitamin K Produkte besteht (Abspaltung von Gruppen im Darm), kann anhand der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt werden. Es könnte auch an einem Einfluß des Depletionshilfsmittels CT gedacht werden. In Versuch IV unterschieden sich die Titer der beteiligten Menadiolverbindungen in Abhängigkeit der CT-Konzentration wenig oder gar nicht (Menadioldiacetat: 69 bei 10 ppm CT; 69 bei 15 ppm CT. Menadioldibutyrat: 71 bei 10 ppm CT; 67 bei 15 ppm CT). Im Gegensatz hierzu änderte sich der Titer von MSB-MEP/D (BASF) von 81 bei 15 ppm CT auf 95 bei 10 ppm CT. Es kann hier eine Beteiligung des Depletionshilfsmittels vermutet werden.

Es könnte aber auch den MSB-Produkten eine bessere biologische Wirksamkeit im Organismus (des Kükens) zugesprochen werden. Betrachtet man den derzeitigen Stand des Wissens über den Wirkungsmechanismus des Vitamin K und hierbei den ersten Schritt der Umwandlung des Quinons zum Hydrochinon, so könnte vermutet

werden, daß die freie Ketogruppe der MSB-Verbindungen leichter reduziert werden kann zum Hydrochinon, als dies bei den Menadiolen mit der veresterten Hydroxygruppe der Fall ist. Ob nun die eine oder andere Vermutung zutrifft, muß weiteren Arbeiten überlassen werden.

Ein weiteres herausragendes Ergebnis war das Auffinden zweier weitgehend hitzestabiler Vitamin K Verbindungen. Es handelt sich hier um das Menadioldiacetat und das Menadioldibutyrat. In Versuch III konnte nach einer langdauernden Hitzebelastung kein Verlust an Vitamin K Wirksamkeit bei diesen beiden Präparationen festgestellt werden. Während die beiden mitgetesteten MSB-Verbindungen MSB-MEF/D (EASF) und MSB (Olpesa) 62 % bzw. 74 % ihrer ursprünglichen Menadion-Aktivität verloren, konnten die Menadiolverbindungen sogar noch leichte Zugewinne in ihrer Wirksamkeit erreichen. Es ist kaum anzunehmen, daß hier ein Fehler im Verfahren ein falsch-positives Ergebnis geliefert hat, weil in allen vier Versuchen gleichgerichtete Unterschiede mehr oder weniger deutlich beobachtet wurden.

Aus dem Stabilitätsversuch kann geschlossen werden, daß die geprüften MSB-Produkte nur ungenügend oder gar nicht stabilisiert waren.

In Versuch IV wurden 10 ppm CT und 15 ppm CT im Futter verglichen. Es wurde deutlich, daß bei der Ermittlung der Regressionsgeraden die Korrelationskoeffizienten günstiger bei 10 ppm CT im Futter lagen. Gleichzeitig jedoch verringerte sich die Steigung der Standardgeraden geringfügig. Letzteres muß als Nachteil angesehen werden, da gerade die Steigung wichtig für die Reproduzierbarkeit und Aussagefähigkeit ist. Es muß daher gefordert werden miteinander zu vergleichende Versuche immer mit der gleichen CT Konzentration durchzuführen, da sonst womöglich falsche Schlüsse auf die Güte eines Präparates gezogen werden. Mögliche Interaktionen zwischen der Dosierung eines Vitamin K Antagonisten und der biologischen Aktivität einer vitaminwirksamen Verbindung können daher angenommen werden. Bekannt ist auch, daß die Wahl des Vitamin K Antagonisten zu einer Änderung der Reihenfolge in der Bewertung verschiedener Substanzen führen kann (Charles et al 1968). Gleichzeitig muß aber angemerkt werden, daß die beschriebenen Interaktionen zu geringfügigen Unterschieden geführt haben und somit die prinzipielle Validität der Ergebnisse und Folgerungen nicht beeinträchtigen.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Den eigenen Versuchen wird eine kurzgefaßte Übersicht der physiologischen Bedeutung von Vitamin K, seines Stoffwechsels und seiner Wirkungsweise, den vitaminwirksamen Verbindungen und Antagonisten vorangestellt.

In vier Versuchen an insgesamt 2268 Hahnenküken einer Mastrasse (Lohmann B 975) wurde die biologische Aktivität von Menadion - bzw. Menadiolpräparaten verglichen. Nach einer Vorperiode von 21 Tagen mit einer Vitamin K-armen Mais-Soja-Ration, der 1 ppm Cumatetralyl (CT) zugesetzt war, wurde den Küken für 14 bis 15 Tage Rationen mit 10 bzw. 15 ppm CT und 30, 60 bzw. 120 ppb Menadion angeboten. Als Parameter diente die Thromboplastinzeit, die mit einem Coagulometer nach Schnitger und Gross ermittelt wurde.

Ergebnisse

Der Einsatz des Coagulometers nach Schnitger und Gross konnte die Aussagefähigkeit der Versuche verbessern.

Die Bestimmung der Gerinnungszeiten mit Citrat-plasmaproben lieferte bessere Ergebnisse, als die mit Citratvollblutproben.

In allen Versuchen konnten signifikante Beziehungen zwischen Thromboplastinzeit und Konzentration des jeweiligen Vitamin K Präparates erzielt werden.

Ein Vergleich von 10 bzw. 15 ppm CT im Futter erbrachte Abweichungen in der Steigung der Regressionsgeraden. Aufgrund der größeren Steigung der Wirkgeraden sind 15 ppm CT im Futter zu bevorzugen.

Geprüft wurden folgende Substanzen:

MSB (Dohyfral^R), MPB (Hetrazeen), Menadioldiacetat, Menadioldibutyrat, MSB-MEP/D (BASF), MSB (Olpesa)

MSB (Dohyfral^R) erwies sich als gutgeeignete Standardsubstanz.

Die biologische Wirksamkeit von MPB lag zwischen MSB und den Menadiolverbindungen (biologische Aktivität ermittelt nach Cavalli-Sforza 1969).

Die biologische Menadionäquivalenz der geprüften Substanzen (bezogen auf MSB (Dohyfral^R) stellte sich wie folgt dar (bei 15 ppm CT im Futter):

	Biologische Menadion- äquivalenz in Prozent	
	Versuch III	Versuch IV
Prüfpräparation		
Menadioldiacetat	60	69
Menadioldibutyrat	50	67
MSB-MEP/D (BASF)	80	81
MSB-Olpesa	60	-

Eine Stabilitätsprüfung (37 °C, gesättigter Wasserdampf, 6 Tage 16 Std. Inkubation) wurde an Menadioldiacetat, Menadioldibutyrat, MSB-MEP/D (BASF) und MSB Olpesa durchgeführt.

Während MSB-MEP/D (BASF) 62 % und MSB Olpesa 74 % an biologischer Aktivität verloren hatten, zeigten die Menadiolverbindungen eine leichte Aktivitätssteigerung (relative Titer nach Belastung: Menadioldiacetat 108, Menadioldibutyrat 109).

9.1. Summary

Comparison of the Biological Activity and Stability of
Various Menadione and Menadiol Preparations

Preceding own examinations, the physiological importance of vitamin K, its metabolism and mode of action, as well as vitamin-active compounds and antagonists are discussed.

In four experiments, involving a total of 2268 male chicks (broiler chicks, Lohman B975), the biological activity of menadione and menadiol preparations was compared.

After feeding a diet low on vitamin k, on a corn-soja-basis, for 21 days with the addition of 1 ppm cumatetralyl (CT), different groups of chicks received diets containing 10 or 15 ppm CT and 30, 60 or 120 ppb menadione for 14 to 15 days. The blood clotting time (TPT) served as parameter and was determined with the help of a coagulometer (Schnitger and Gross).

Results:

The employment of the coagulometer by Schnitger and Gross increased the credibility of the experiments.

Blood clotting times using citrate plasma yielded better results compared to citrate fullblood.

In all experiments a significant relationship between blood clotting time and vitamin K concentration of the respective preparation could be determined.

The comparison of 10 and 15 ppm CT in the diets showed differences in the steepness of the regression-lines. Due to the greater steepness of the regression-line in the diets with 15 ppm CT this concentration is to be preferred.

Following substances were tested:

MSB (Dohyfral^R), MPB (Hetrazeen), Menadioldiacetat, Menadioldibutyrate, MSB-MEP/D (BASF), MSB (Olpesa)

MSB (Dohyfral^R) was found to be a suitable standard.

The biological activity of MPB ranged between that of MSB and of the menadiol preparations (the biological activity was determined according to Cavalli-Sforza, 1969).

The biological menadione equivalence of the tested substances (with reference to MSB (Dohyfral^R)) was found to be as follows (with 15 ppm CT in the diet):

	Biological Menadione Equivalence in Percent	
	Test III	Test IV
Preparation		
Menadioldiacetat	60	69
Menadioldibutytrat	50	67
MSB-MEP/D (BASF)	80	81
MSB-Olpesa	60	-

The stability of Menadioldiacetat, Menadioldibutytrat, MSB-MEP/D (BASF) and MSB Olpesa (incubation for 6 days and 16 hrs using saturated vapour and 37 °C) was determined.

While the biological activity of MSB-MEP/D (BASF) was reduced by 62 % and that of MSB-Olpesa by 74 %, the menadiol compounds showed slight increase in their biological activity (relative titer after incubation Menadioldiacetat 108, Menadioldibutytrat 109).

10. TABELLENANHANG: VARIANZTABELLEN ZU VERSUCH III

**DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN
MENADIOL-DIACETAT (TEST)**

	Standard			Test		
Dosis (ppb)	30	60	120	34,5	69	138
log dos	1,477	1,778	2,079	1,538	1,839	2,140
TPZ (sec)	155	124	103	158	137	122
s	56	31	25	41	38	32
n	8	8	8	8	8	8

MENADIOL-TEST: 60 % (29 - 125 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s ²	F	P
Gesamt	79.920,83	47			
Präparate	1.691,00	1	1.691,00	1,143	> 0,25
Regression	15.550,22	1	15.550,22	10,515	< 0,005
Parallelität	480,56	1	480,56	0,325	*
Linearität	85,62	1	85,62	0,058	*
Restfehler	62.113,43	42	1.478,89		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,36$

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN
MENADIOL-DIACETAT BELASTET

	Standard			Test belastet	
Dosis (ppb)	30	60	120	51,75	103,5
log dos	1,477	1,778	2,079	1,714	2,015
TPZ (sec)	155	124	103	147	124
s	56	31	25	18	27
n	8	8	8	8	8

MENADIOL-TITER: 66 % (36 - 122 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s^2	F	P
Gesamt	54.012,75	39			
Präparate	625,98	1	625,98	0,542	*
Regression	12.831,74	1	12.831,74	11,116	< 0,005
Parallelität	27,85	1	27,85	0,024	*
Linearität	124,16	1	124,16	0,108	*
Restfehler	40.403,02	35	1.154,37		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,37$

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN
MENADIOL-DIBUTYRAT (TEST)

	Standard			Test	
Dosis (ppb)	30	60	120	51,75	103,5
log dos	1,477	1,778	2,079	1,714	2,015
TPZ (sec)	155	124	103	155	135
s	56	31	25	34	32
n	8	8	8	8	8

MENADIOL-TITER: 50 % (24 - 106 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s ²	F	P
Gesamt	63.540,71	39			
Präparate	2.919,00	1	2.919,00	2,119	> 0,1
Regression	12.167,43	1	12.167,43	8,834	< 0,005
Parallelität	125,87	1	125,87	0,091	*
Linearität	123,57	1	123,57	0,090	*
Restfehler	48.204,84	35	1.377,28		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,37$

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN
MENADIOL-DIBUTYRAT BELASTET

	Standard			Test belastet	
Dosis (ppb)	30	60	120	51,75	103,5
log dos	1,477	1,778	2,079	1,714	2,015
TPZ (sec)	155	124	103	153	131
s	56	31	25	20	34
n	8	8	8	8	8

MENADIOL-TITER: 54 % (25 - 133 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s ²	F	P
Gesamt	58.524,04	39			
Präparate	2.136,66	1	2.136,66	1,715	≥ 0,1
Regression	12.592,22	1	12.592,22	10,105	< 0,005
Parallelität	54,78	1	54,78	0,044	*
Linearität	124,13	1	124,13	0,100	*
Restfehler	43.616,25	35	1.246,18		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,37$

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN

M E P I D (TEST)

	Standard			Test	
Dosis (ppb)	30	60	120	45	90
log dos	1,477	1,778	2,079	1,653	1,954
TPZ (sec)	155	124	103	144	123
s	56	31	25	25	26
n	8	8	8	8	8

M E P I D TITER: 80 % (42 - 150 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s ²	F	P
Gesamt	54.912,45	39			
Präparate	352,11	1	352,11	0,294	*
Regression	12.404,09	1	12.404,09	10,348	< 0,005
Parallelität	77,37	1	77,37	0,065	*
Linearität	123,53	1	123,53	0,103	*
Restfehler	41.955,35	35	1.198,72		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,37$

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN

M E P I D BELASTET

	Standard			Test belastet	
Dosis (ppb)	30	60	120	45	90
log dos	1,477	1,778	2,079	1,653	1,954
TPZ (sec)	155	124	103	181	153
s	56	31	25	40	29
n	8	8	8	8	8

M E P I D TITER: 33 % (13 - 83 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s ²	F	P
Gesamt	79.471,91	39			
Präparate	15.436,90	1	15.436,90	10,800	0,005
Regression	13.865,69	1	13.865,69	9,700	0,005
Parallelität	13,49	1	13,49	0,009	*
Linearität	123,57	1	123,57	0,086	*
Restfehler	50.032,26	35	1.429,49		

* Für P 0,25 ist F = 1,37

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN

MSB OLPESA (TEST)

	Standard			Test	
Dosis (ppb)	30	60	120	45	90
log dos	1,477	1,778	2,079	1,6532	1,9542
TPZ (sec)	155	124	103	152	134
s	56	31	25	36	43
n	8	8	8	8	8

MSB TITER: 60 % (27 - 134 %)

VARIANTENTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s^2	F	P
Gesamt	69.710,16	39			
Präparate	2.423,16	1	2.423,16	1,538	0,1
Regression	11.804,74	1	11.804,74	7,492	0,010
Parallelität	211,18	1	211,18	0,134	*
Linearität	123,79	1	123,79	0,079	*
Restfehler	55.147,29	35	1.575,64		

* Für P 0,25 ist F = 1,37

DOHYFRAL (STANDARD) GEGEN
MSB OLPESA BELASTET

	Standard			Test belastet	
Dosis (ppb)	30	60	120	45	90
log dos	1,477	1,778	2,079	1,653	1,954
TPZ (sec)	155	124	103	190	170
s	56	31	25	58	56
n	8	8	8	8	8

MSB TITER: 21 % (5 - 99 %)

VARIANZTABELLE

Ursache	Abweichungs- quadrate	FG	s^2	F	P
Gesamt	117.331,31	39			
Präparate	26.712,60	1	26.712,60	11,957	< 0,005
Regression	12.182,18	1	12.182,18	5,453	< 0,025
Parallelität	123,02	1	123,02	0,055	*
Linearität	123,44	1	123,44	0,055	*
Restfehler	78.190,06	35	2.234,00		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,37$

VARIANZTABELLEN ZU VERSUCH IV

MENADIOL - DIACETAT (10 ppm CT)

Menadion (ppb)	Dohyfral			Menadiol	
	30	60	120	90	180
TPZ (sec)	123	99	81	98	83
t-s	16	8	10	10	8

Titer 69 % (Vertrauensbereich: 52 - 91 %)

VARIANZTABELLE

Streuungsursache	SQ	FG	s ²	F	P
Gesamt	11494	34			
Versuchsgruppen	7973	4	1993	16,983	< 0,001
Präparate	993	1	993	8,463	< 0,010
Regression	6875	1	6875	58,575	< 0,001
Parallelität	72	1	72	0,615	*
Linearität	33	1	33	0,279	*
Versuchsfehler	3521	30	117		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

MENADIOL - DIACETAT (15 ppm CT)

Menadion (ppb)	Dohyfral			Menadiol	
	30	60	120	90	180
TPZ (sec)	149	127	104	125	105
$\pm s$	31	29	19	15	18

Titer 69 % (Vertrauensbereich: 40 - 117 %)

(bei Berücksichtigung der Streuungsursache Versuchstage:
46 - 102 %)

VARIANZTABELLE

Streuungsursache	SQ	FG	s^2	F	P
Gesamt	26010	34			
Versuchsgruppen	9576	4	2394	4,370	< 0,010
Präparate	1175	1	1175	2,145	> 0,1
Regression	8393	1	8393	15,321	< 0,001
Parallelität	8	1	8	0,014	*
Linearität	0,1	1	0,1	0,000	*
(1./2. Versuchshälfte)	7921	1)			
Versuchsfehler	16434	30	548		
(Versuchsfehler)	8513	29	294)		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

M E N A D I O L - D I B U T Y R A T (10 ppm CT)

Menadion (ppb)	Dohyfral			Menadiol	
	30	60	120	100	200
TPZ (sec)	123	99	81	96	75
$\pm s$	16	8	10	13	8

Titer 71 % (Vertrauensbereich: 53 - 96 %)

V A R I A N Z T A B E L L E

Streuungsursache	SQ	FG	s ²	F	P
Gesamt	13633	34			
Versuchsgruppen	9731	4	2433	18,706	< 0,001
Präparate	2073	1	2073	15,939	< 0,001
Regression	7625	1	7625	58,631	< 0,001
Parallelität	0,1	1	0,1	0,001	*
Linearität	33	1	33	0,252	*
Versuchsfehler	3902	30	130		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

MENADIOL - DIBUTYRAT (15 ppm Cr)

Menadion (ppb)	Dohyfral			Menadiol	
	30	60	120	100	200
TPZ (sec)	149	127	104	122	103
$\pm s$	31	29	19	29	14

Titer 67 % (Vertrauensbereich: 36 - 125 %)

(bei Berücksichtigung der Streuungsursache Versuchstage:
44 - 101 %)

VARIANZTABELLE

Streuungsursache	SQ	FG	s^2	F	P
Gesamt	29514	34			
Versuchsgruppen	9972	4	2493	3,827	< 0,025
Präparate	1729	1	1729	2,655	> 0,1
Regression	8221	1	8221	12,620	< 0,005
Parallelität	22	1	22	0,033	*
Linearität	0,1	1	0,1	0,000	*
(1./2. Versuchshälfte	11102	1)			
Versuchsfehler	19542	30	651		
(Versuchsfehler	8440	29	291)		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

M E P I D (MSB - BASF) (10 ppm CT)

Menadion (ppb)	Dohyfral			Menadion	
	30	60	120	66	132
TPZ (sec)	123	99	81	101	78
$\pm s$	16	8	10	11	10

Titer 95 % (Vertrauensbereich: 72 - 124 %)

V A R I A N Z T A B E L L E

Streuungsursache	SQ	FG	s ²	F	P
Gesamt	12801	34			
Versuchsgruppen	9013	4	2253	17,847	< 0,001
Präparate	1160	1	1160	9,189	< 0,005
Regression	7814	1	7814	61,890	< 0,001
Parallelität	6	1	6	0,048	*
Linearität	33	1	33	0,260	*
Versuchsfehler	3788	30	126		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

M E P I D (MSB - BASF) (15 ppm CT)

	Dohyfral			Menadion	
Menadion (ppb)	30	60	120	66	132
TPZ (sec)	149	127	104	130	108
+s	31	29	19	28	17

Titer 81 % (Vertrauensbereich: 46 - 144 %)

(bei Berücksichtigung der Streuungsursache Versuchstage:
57 - 116 %)

V A R I A N Z T A B E L L E

Streuungsursache	SQ	FG	s ²	F	P
Gesamt	28750	34			
Versuchsgruppen	9026	4	2257	3,432	< 0,025
Präparate	471	1	471	0,717	> 0,1
Regression	8554	1	8554	13,010	< 0,005
Parallelität	1	1	1	0,002	*
Linearität	0,1	1	0,1	0,000	*
(1./2. Versuchshälfte	12175	1)			
Versuchsfehler	19724	30	657		
(Versuchsfehler	7549	29	260)		

* Für $P \leq 0,25$ ist $F = 1,38$

11. LITERATURVERZEICHNIS

Barash, P.G.

Nutrient Toxicities of Vitamin K
CRC Handbook Series in Nutrition and Food
Vol I (Nutritional Disorders) 97-100
Herausgeber: Miloslav Reckcigl, Jr
CRC Press, Inc, Palm Beach (1978)

Barnhart, M.J; Anderson, G.F.

Prothrombin Synthesis in the Dog
Am. J. Physiol. 206, 929-938 (1964)

Bell, R.G; Matschiner, J.T.

Synthesis and Destruction of Prothrombin in the Rat
Arch. Biochem Biophys., 135, 152 (1969)

Bell, R.G; Sadowsky, J.A; Matschiner, J.T.

Mechanism of Action of Warfarin
Warfarin and Metabolism of Vit K1
Biochemistry 11, 1959-1961 (1972)

Bomhard, E; Schulz, V; Groppe, J.

Zur Bestimmung von Vitamin K Aktivität im biologischen
Verfahren. 1 Mitt. Vitamin K, Wirkungsweise und
biologische Bestimmung
Z. Tierphysiol., Tierern. Futtermittelkde, 34, 237 (1975)

Brodie, A.F.

Vitamin K and other Quinones as Coenzymes in oxydative
Phosphorylation in bacterial Systems
Fed. Proc, Fed. Americ. Soc. Exp. Biol, 20, 995 (1961)

Charles, O.W; Dielworth, B.C; Dag, E.J.

Chick Bioassay of Vitamin K Compounds using
Dicumarol and Pivalyl as anticoagulants
Poultry Sci, 47; 754-760 (1968)

Cavalli-Sforza, L.

Biometrie
Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik
(2. Auflage, 101-146)
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1969)

Dam H; Schönheyder, F; Tage-Hansen, E.
The Antihemorrhagic Vitamin of the Chick
Nature 135, 652-653 (1935)

Doerr, J.A; Wyatt, R.D; Hamilton, D.B.
Investigation and Standardization of Prothrombin
Times in Chickens Poultry Sci 54/2; 969-980 (1975)

Doisy, E.A.
Vitamin K in Human Nutrition
Symp. Proc. Assoc. Chemists
Chicago, Illinois 30, 79 (1971)

Dorn, P.
Zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung
beim Huhn
med vet habil, München (1965)

Fasco, M.J; Prensche, P.C; Hildenbrandt, E;
Suttie, J.W.
Formation of Hydroxyvitamin K by Vitamin K
Epoxide Reductase of Warfarin Rats
J. Biol. Chem. 258; 4372-4380 (1983)

Grimminger, P.
Vitamin K Activity in Chickens:
Phylloquinone and Menadione in the Presence
of Stressagents
J. Nutr. 87, 337-343 (1965)

Gropp, J; Bomhard, E; Schulz, V; Busch, L; Wetzel, A.
Zur Bestimmung von Vitamin K Aktivität im biolog-
ischen Verfahren. 3. Mitt. Vergleichende Stabilitäts-
untersuchungen von Menadion-Natrium-Bisulfit und
Menadion- Pyrimidinol-Bisulfit
Z. Tierphysiol., Tierern., Futtermittelkde 34, 325 (1975)

Harris, R.S.
Nomenclature and Formulas
The Vitamins
Vol III sec. edition 416-522
Herausgeber: Sebrell, W.H; Harris, R.S.
Academic Press, New York and London (1971)

Hauschka, P.V.
Osteocalcin: A Vitamin K Dependent Calcium-Binding-
Protein in Bone
Nutr. Rev. 37, 54-57 (1979)

Heimbürger, N; Trobisch, H.
Blutgerinnung und Fibrinolyse
Angew. Chem. 83; 89-102 (1971)

Hollander, D; Rim, E; Muralidhara, K.S.
Colonic Absorption of Bacterially Synthesized
Vitamin K₂ in the Rat
Americ. J. Phys. 230; 251-255 (1976)

Hollander, D; Rim, E; Muralidhara, K.S.
Vitamin K₁ Intestinal Absorption in Vivo:
Influence of Luminal Contents on Transport
Americ. J. Phys. 1, E 232 C+E, E 69-E74 (1977)

Link, K.P; Campbell, H.A.
Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease
The Isolation and Crystallisation of the Hemorrhagic
Agent
J. Biol. Chem. 138, 21 (1941)

Magnusson, S;
Primary Structure of the Vitamin K
Dependent Part of Prothrombin
Fed. European Biochem. Soc. Letters 44
189-193 (1974)

Martius, C. Nitz-Litzow, D.
Oxydative Phosphorylierung und Vitamin K Mangel
Biochim. Biophys. Acta 13, 152 (1954)

Matschiner, J.T. Zimmermann, A. Bell, R.G.
The Influence of Warfarin on Vitamin K Epoxide
Reductase
Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl 57, 45-52 (1974)

Maynard A; Looslie J.K. Hintz, H.F; Warner, R.G.
The Vitamins (Chapter 11)
Animal Nutrition 7th Edition 283-355
Mc Graw-Hill Book Company (1979)

Morrissey, J.J.
Fed. Proc., Fed. Americ. Soc. Exp. Biol. 32 317 (1973)
zitiert nach Olson, R.E. (1974)

Olson, R.E.
New Concepts relating to the Mode of Action of Vitamin K
Vitamins and Hormones 32, 483-508
Herausgeber: Harris, Munson, Glover, Diczfalussy
Academic Press, New York - San Francisco - London (1974)

Olson, R.E.
Vitamin K Reduction Precedes Epoxidation and
Prothrombin Synthesis
Nutr. Rev. 36, 20-21 (1978)

Olson, R.E.

Effect of Vitamin D Status on Vitamin K Dependent
Osteocalcin Formation

Nutr. Rev. 40; 249-250 (1982)

Olson, R.E.

Conversion of Vitamin K Epoxide to Hydroxivitamin K
by Liver Microsomes from Warfarin-Resistant Rats

Nutr. Rev. 41; 253-254 (1983)

Olson, R.E.

The function of the Vitamin K Dependent Proteins,
Bone-Gla-Protein (BGP) and Kidney-Gla-Protein (KGP)

Nutr. Rev. 42; 161-163 (1984)

Perlik, E.

Antikoagulantien

Edition Leipzig (1964)

Price, P.A.; Otsuka, A.S.; Poser, J.W.; Kristaponis, J;
Raman, N.

γ -Carboxyglutamic Acid Containing Protein from Bone
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73; 1447-1451 (1976)

Preusch, P.C.; Suttie, J.W.

Vitamin K Dependent Reactions in Rat Liver: Role
of Flavoproteins

Journ. of Nutr. 111; 2087-2097 (1981)

Qick, A.J. Collentine, J.

Role of Vitamin K in the Synthesis of Prothrombin

Am. J. Physiol. 164, 716 (1951)

Schulz, V.; Bomhard, E.; Gropp, J.

Zur Bestimmung von Vitamin K Aktivität im biologischen
Verfahren. 2. Mitt.

Zur Entwicklung eines Testverfahrens an Hühnerküken

Z. Tierphysiol., Tierern., Futtermittelkde, 34, 352
(1975)

Shearer: Mc Burney; Breckenridge; Barkhan

Dose-Response Relationship between Warfarin and the
Metabolism of Vitamin K₁ in Man

Internat. J. Vitamin and Nutr. Res. 46; 215-219 (1976)

Stenflo, J. Fernhind, P; Egan, W; Roepstorff, P;
Vitamin K Dependent Modifications of Glutaminicacid
Residues in Prothrombin
Proc. Natl. Acad. Sci 71; 2730-2733 (1974)

Suttie, J.W.
The Effect of Cycloheximid Administration on Vitamin
K Stimulated Prothrombin Formation
Arch. Biochem. Biophys. 141; 571-578 (1970)

Suttie, J.W.
Vitamin K and Prothrombin Synthesis
Nutr. Rev. 31; 105-109 (1973)

Suttie, J.W.
Metabolism and Properties of a Liver Precursor to
Prothrombin
Vitamins and Hormones 32; 463-479
Herausgeber: Harris, Munson, Glover, Diczfalusy
Academic Press New York - San Francisco - London (1974)

Suttie, J.W. Jackson, C.M.
Prothrombin Structure, Activation and Biosynthesis
Phys. Rev. 57/1; 1-70 (1977)

Suttie, J.W.
A Proposed Mechanism for Vitamin K
Dependent γ -Carboxylation of Glutamic-Acid
Nutr. Rev. 40; 311-312 (1982)

Sweet, G.B; Romoser, G.L; Combs, G.F.
Further Observation on the Effect of Sulfaquinoxaline,
 α -Aminophenylarsenicacid and Oregtetracycline on Blood
Clotting Time of Chicks
Poultry Sci. 33; 430-432 (1954)

Wallin, R; Gebhardt, O; Prydz, H.
NAD(P)H -Dehydrogenase and its Role in the Vitamin K
Dependent Carboxylation Reaction
Biochem. J. 169; 95-101 (1978)

Walz, D.A. Kipfer, R.K; Olson, R.E.
Effects of Vitamin K Deficiency,
Warfarin and Inhibitors of Protein Synthesis upon
Plasma Levels of Vitamin K Dependent Clotting Factors
in Chick
Journ. of Nutr. 105/2; 972-981 (1975)

Weiser, H. Kormann, A.W.
Biopotency of Vitamin K
Internat. J. Vitamin and Nutr. Res. 53;
143-155 (1983)

Willingham, A.K. Matschiner J.T.
Changes in Phylloquinone Epoxidase
Activity Related to Prothrombin Synthesis and
Microsomal Clotting Activity
Biochim. J. 140; 435-441 (1974)

anonym

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Gropp für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit großzügig gewährte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Für die tatkräftige Unterstützung bedanke ich mich bei der Belegschaft des Oberwiesenfelds und recht herzlich bei den Tierpflegern.

LEBENS LAUF

	<u>Wolfgang</u> Hans Mehringer
Geburtsdatum:	27.7.1956
Geburtsort:	Selb, Oberfranken
Vater:	Johann <u>Christian</u> Mehringer, Verwaltungssekretär
Mutter:	<u>Maximiliana</u> Maria Mehringer geb. Stief
Ausbildung:	
1963 - 1967	Volksschule in Selb, Oberfranken
1967 - 1976	Gymnasium der Stadt Selb
25. Juni 1976	Abitur
1976 - 1977	Grundwehrdienst
1977 - 1982	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
30. November 1982	Tierärztliches Staatsexamen III. Teil
1. Februar 1983	Tag der Approbation

